

Untersuchungen zu regulatorischen T-Zellen (Treg) beim Multiplen Myelom

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.
des Fachbereichs
Biologie und Geographie
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Bärbel Hülsmann

aus Münster

Oktober 2009

Die der vorliegenden Arbeit zu Grunde liegenden Untersuchungen und Experimente wurden an der Inneren Klinik (Tumorforschung), Direktor Prof. Dr. S. Seeber, seit 01.10.2007 Direktor Prof. Dr. med. M. Schuler, der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. B. Opalka

2. Gutachter: Prof. Dr. U. Dittmer

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. J. Buer

Tag der mündlichen Prüfung: 10.03.2010

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	v
Abbildungsverzeichnis.....	vii
Tabellenverzeichnis.....	x
1. Einleitung.....	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.2 T-Zellen und ihre Subpopulationen	3
1.3 Regulatorische T-Zellen (Treg)	6
1.3.1 Aktivierung und Proliferation von Treg	7
1.3.2 Phänotypische Charakterisierung von Treg.....	8
1.3.3 Isolierungsmöglichkeiten von Treg anhand ihres Phänotyps.....	11
1.3.4 Suppressions-Mechanismen von Treg	12
1.3.5 Treg bei soliden Tumorerkrankungen.....	15
1.3.6 Treg bei hämatologischen Erkrankungen	17
1.3.6.1 Das Multiple Myelom.....	18
1.3.6.2 Treg beim Multiplen Myelom	21
1.4 Ziel der Arbeit.....	22
2. Material und Methoden	23
2.1 Material	23
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	23
2.1.2 Zellkulturmedien und Zusätze	23
2.1.3 Kits	23
2.1.4 Antikörper	24
2.1.5 Wachstumsfaktoren.....	25
2.1.6 Puffer und weitere Lösungen.....	25
2.1.7 Geräte	25
2.1.8 Primäre Zellen	26
2.1.9 Normale Spender	26
2.1.10 Patientenproben Multiples Myelom (MM)	27
2.1.11 Patientenproben Bronchialkarzinom (BK).....	29
2.2 Zellkulturtechniken	29
2.2.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen	29
2.2.2 Kryokultivierung von eukaryotischen Zellen	30
2.2.3 Bestimmung von Zellzahlen	30
2.2.4 Antikörperfärbung von Zellen	31
2.2.5 Durchflußzytometrie	31

2.3	Aufarbeitung von Blut- bzw. Knochenmarkproben von MM-Patienten zur Analyse mittels eines Durchflußzytometers	32
2.3.1	Erstellung der Antikörperprotokolle für die Oberflächenmarkeranalysen	33
2.3.2	Optimierung des Antikörperpanels für die Oberflächenmarkeranalysen	34
2.3.3	Intrazelluläre Färbung mit Anti-FOXP3-Antikörpern	34
2.4	Isolierung der mononukleären Zellfraktion aus Vollblut	35
2.4.1	Aufreinigung mononukleärer Zellen mittels Dichtegradient-Zentrifugation („lange“ Methode)	35
2.4.2	Aufreinigung mononukleärer Zellen mittels Dichtegradient-Zentrifugation („kurze“ Methode)	36
2.5	Isolierung von Treg aus peripherem Blut bzw. Buffy Coat-Präparaten von normalen Spendern	36
2.5.1	Isolierung von Treg über magnetische Beads und Säulen (System Miltenyi)	37
2.5.2	Isolierung von Treg über magnetischer Beads ohne Verwendung von Säulen (System Dynal).....	38
2.5.3	Isolierung von Treg mittels magnetischer Beads und eines präparativen Durchflußzytometers (FACS).....	40
2.5.4	Isolierung von Treg über ein FACS	40
2.6	Expansion isolierter Treg	41
2.6.1	Expansion mit Hilfe von beschichteten Platten und löslichen Antikörpern	41
2.6.2	Expansion mit Hilfe von beschichteten Beads (Dynabeads Human Treg Expander)	42
2.7	Suppressionstest mit isolierten Treg	42
2.7.1	Test verschiedener Stimulierungssysteme	42
2.7.2	Testaufbau A	43
2.7.3	Testaufbau B	44
2.8	Statistische Analysen	45
3.	Ergebnisse.....	46
3.1	Etablierung eines Durchflußzytometerprotokolls zur Messung von Treg normaler Spender im Vergleich zu MM-Patienten	46
3.1.1	Validierung der Treg-Messprotokolle anhand eines Vergleichs der prozentualen und absoluten Treg-Zahlen im peripheren Blut von BK-Patienten und normalen Spendern	51
3.1.2	Quantitiver Vergleich der Treg-Zellen im peripheren Blut von normalen Spendern und MM-Patienten.....	52
3.1.3	Einfluß der Therapie und verschiedener Krankheitsparameter von MM-Patienten auf die prozentuale und absolute Treg-Zahl im peripheren Blut	54

3.1.4	Quantitativer Vergleich der Treg im Knochenmark und im peripheren Blut von MM-Patienten	60
3.1.5	Einfluß der Therapie und verschiedener Krankheitsparameter von MM-Patienten auf die prozentuale und absolute Treg-Zahl im Knochenmark	61
3.1.6	Vergleich der prozentualen Anteile und absoluten Treg-Zahlen im peripheren Blut von Patienten mit Multiplen Myelom und Patienten mit solidem Tumor (Bronchialkarzinom)	65
3.2	Analyse der Treg-Werte bei zwei MM-Patienten vor, während und nach einer Immuntherapie	66
3.3	Isolierungen von Treg aus peripherem Blut normaler Spender und Buffy Coat-Präparaten	71
3.3.1	Vergleich zweier Methoden zur Treg-Isolierung mittels magnetischer Beads.	72
3.3.2	Treg-Isolierungen mittels FACS	76
3.4	In-vitro-Expansion isolierter Treg	81
3.5	Funktionelle Tests der aus Spenderblut oder Buffy Coat-Präparaten isolierten Treg-Zellen	86
4.	Diskussion	91
4.1	Treg-Messungen bei Patienten mit Multiplem Myelom (MM)	91
4.1.1	Validierung durchflußzytometrischer Protokolle zur Identifizierung von Treg	91
4.1.2	Identifizierung der gemessenen Zellfraktion als Treg	93
4.1.3	Treg exprimieren CD85j	94
4.1.4	Treg-Zahlen im peripheren Blut von MM-Patienten	95
4.1.4.1	<i>Vergleich der Treg-Zahlen von normalen Spendern und MM-Patienten</i>	<i>95</i>
4.1.4.2	<i>Messung der Treg-Zahlen im peripheren Blut von MM-Patienten ohne Therapie, mit Chemotherapie und mit Hochdosis-Chemotherapie</i>	<i>98</i>
4.1.4.3	<i>Möglicher Einfluß weiterer Krankheitsparameter auf Treg-Zahlen im peripheren Blut von MM-Patienten</i>	<i>100</i>
4.1.5	Unterschiede zwischen Treg-Zahlen im peripheren Blut und im Knochenmark von MM-Patienten	102
4.1.6	Vergleich der Treg-Zahlen im peripheren Blut von BK-Patienten (solider Tumor) und MM-Patienten (hämatologische Erkrankung). .	105
4.1.7	Möglicher Einfluß einer Immuntherapie auf Treg-Zahlen bei MM-Patienten	105
4.2	Treg-Isolierungen, Expansionen und funktionelle Tests	108
4.2.1	Vergleich verschiedener Treg-Isolierungsmethoden	108
4.3	Expansion von Treg	111

4.4	Suppression der Proliferation von CD4 ⁺ CD25 ⁻ -Zellen durch Treg.....	113
4.5	Ausblick.....	115
5.	Zusammenfassung	116
6.	Literatur	118

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
APZ	Antigen präsentierende Zelle
BK	Bronchialkarzinom
BSA	bovines Serumalbumin
CD	„Cluster of differentiation“
cpm	„counts per minute“
CTLA-4	„cytotoxic T lymphocyte antigen-4“
CTX	Chemotherapie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DZ	Dendritische Zelle
ECD	PE-Texas Red
EDTA	Ethyldiamin-Tetraessigsäure
FACS	“fluorescence-activated cell sorting”
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
GITR	“glucocorticoid induced tumor necrosis factor (TNF) rezeptor”
G-CSF	„granulocyte-colony stimulating factor“
GM-CSF	“granulocyte-macrophage-colony stimulating factor”
GvHD	“graft versus host disease”
h	Stunde
HD-CTX	Hochdosis-Chemotherapie
Id	Idiotyp
IL	Interleukin
KM	Knochenmark
L-Glu	L-Glutamin
MGUS	“monoclonal gammopathy of undetermined significance”
min	Minute
ml	Milliliter
MM	Multiples Myelom

MW	Mittelwert
n.d.	nicht durchgeführt
NS	normaler Spender
NSCLC	nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
P/S	Penicillin + Streptomycin
PB	Peripheres Blut
PBS	phosphatgepufferte Saline
PC5	Peridinin-Chlorophyllprotein
PE	Phycoerythrin
RT	Raumtemperatur
SCLC	kleinzelliges Bronchialkarzinom
Sec	Sekunde
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
Treg	Regulatorische T-Zelle
TZR	T-Zell Rezeptor
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/ml	„Units per milliliter“

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Schematische Darstellung der Hämatopoese.....	3
Abbildung 1.2:	Differenzierung von Th-Vorläuferzellen in Treg oder Effektor-T-Zellen.....	6
Abbildung 1.3:	Mechanismen der Suppression von T-Effektorzellen durch Treg.	12
Abbildung 2.1:	Neubauer-Zählkammer	31
Abbildung 2.2:	Funktion eines Durchflußzytometers.....	32
Abbildung 2.3:	Erklärung eines Boxplot-Diagramms.....	45
Abbildung 3.1:	Fenster („Gates“) für die Messung der Treg.	47
Abbildung 3.2:	Messungen Treg spezifischer Oberflächenmarker	50
Abbildung 3.3:	Relative und absolute Treg-Zahlen im peripheren Blut von unbehandelten BK-Patienten verglichen mit denen von normalen Spendern.....	52
Abbildung 3.4:	Quantitativer Vergleich der Treg im peripheren Blut normaler Spender und MM-Patienten.	53
Abbildung 3.5:	Quantitativer Vergleich der Treg im peripheren Blut normaler Spender und unbehandelter MM-Patienten.	54
Abbildung 3.6:	Quantitativer Vergleich der Treg im peripheren Blut von unbehandelten MM-Patienten, Patienten mit CTX und Patienten mit HD-CTX.	55
Abbildung 3.7:	Absolute Zellzahlen der CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -Zellen bei MM-Patienten ohne Therapie, mit CTX und mit HD-CTX im peripheren Blut.	57
Abbildung 3.8:	Analyse der Treg Zahlen im Bezug auf die Krankheitsstadien und die Aktivität der Krankheit im peripheren Blut von MM-Patienten.....	59
Abbildung 3.9:	Vergleich der prozentualen und absoluten Treg-Zahlen im peripheren Blut und im Knochenmark von MM-Patienten.....	60
Abbildung 3.10:	Vergleich der prozentualen und absoluten Treg-Zahlen im Knochenmark bei MM-Patienten ohne Therapie, mit CTX und mit HD-CTX.	62
Abbildung 3.11:	Absolute Zellzahlen der CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -Zellen bei MM-Patienten ohne Therapie, mit CTX und mit HD-CTX im Knochenmark.....	63

Abbildung 3.12: Treg-Zahlen im Knochenmark bezogen auf das Krankheitsstadium und die Aktivität der Krankheit.	64
Abbildung 3.13: Analysen der relativen und absoluten Treg-Zahlen von unbehandelten MM-Patienten im Vergleich zu unbehandelten BK-Patienten.....	65
Abbildung 3.14: Prozentualer Verlauf der Treg Zahlen zweier MM-Patienten unter Immuntherapie.....	67
Abbildung 3.15: Verlauf der absoluten Treg-Zahlen zweier MM-Patienten unter Immuntherapie.....	68
Abbildung 3.16: Verlauf der absoluten CD4 ⁺ -Zahlen zweier MM-Patienten unter Immuntherapie.....	69
Abbildung 3.17: Verlauf der absoluten CD8 ⁺ -Zahlen zweier MM-Patienten unter Immuntherapie.....	70
Abbildung 3.18: Schematische Darstellung der Treg-Isolierung nach Miltenyi im Vergleich zu Dynal.....	74
Abbildung 3.19: Ausbeute und Reinheit der CD4 ⁺ - und Treg-Fraktion beim Vergleich der Aufreinigung mit den Firmen Miltenyi und Dynal (Methode: Magnetische Beads)	76
Abbildung 3.20: Isolierung von Treg mittels FACS.	77
Abbildung 3.21: Schematische Darstellung der Treg-Isolierung mittels FACS.	79
Abbildung 3.22: Ausbeute und Reinheit der CD4 ⁺ - und Treg-Fraktion beim Vergleich der Aufreinigungsmethoden mittels FACS.....	81
Abbildung 3.23: Expansion von Treg-Zellen mittels des Dynabeads human Treg-Expander-Kits der Firma Dynal (Tag1-8 nach Zugabe der Beads).....	83
Abbildung 3.24: Expansionskultur von CD4 ⁺ CD25 ⁻ -Zellen mittels des Dynabeads human Treg-Expander-Kits der Firma Dynal (Tag1-8 nach Zugabe der Beads).	83
Abbildung 3.25: Expansion von Treg im Vergleich zu CD4 ⁺ CD25 ⁻ -Zellen.	84
Abbildung 3.26: FOXP3-Färbung von Treg und CD4 ⁺ CD25 ⁻ -Zellen.....	85
Abbildung 3.27: Kokulturen Treg:CD25 ⁻ 1:1 und Treg:CD25 ⁻ 0:2 an Tag 3 der Kultur (expandierte Zellen aus einer Vollblutspende).....	87

Abbildung 3.28: Exemplarischer funktioneller Test mit expandierten Zellen (Spender 1028; Tabelle 3.2).....	88
Abbildung 3.29: Exemplarischer funktioneller Test mit nicht expandierten Zellen (Spender 1043; Tabelle 3.3).....	90

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: MM-Stadien nach Durie and Salmon, 1975.	19
Tabelle 3.1: Charakterisierung der in Gate M gemessenen Treg bezüglich ihrer Oberflächenmarker.....	48
Tabelle 3.2: Suppressionstest mit expandierten Treg und CD4 ⁺ CD25 ⁻ -Zellen.	88
Tabelle 3.3: Suppressionstest mit nicht-expandierten Treg und CD4 ⁺ CD25 ⁻ -Zellen.	89

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem hat die Aufgabe, den Organismus vor Infektionen durch Viren, Bakterien, Pilze oder Parasiten zu schützen. Es besteht vereinfacht gesagt aus Immunzellen, löslichen Faktoren und lymphatischen Geweben und Organen. Man unterscheidet zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem. Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems zählen vorwiegend die Monozyten, Makrophagen, Granulozyten (neutrophile, eosinophile und basophile), Mastzellen und natürliche Killerzellen. Makrophagen werden zudem auch der erworbenen (adaptiven) Immunantwort als Antikörper-präsentierende Zellen (APZ) zugeordnet (Delves and Roitt, 2000a; Delves and Roitt, 2000b). Im Vergleich zum angeborenen Immunsystem besitzt das adaptive Immunsystem aufgrund der von B- und T-Zellen vermittelten spezifischen Erkennung und Abwehr von beispielsweise Mikroorganismen, virusinfizierten Zellen oder Tumorzellen, eine größere Spezifität. Die Ketten der antigenspezifischen Rezeptoren dieser Zellen verfügen über eine konstante und eine variable Region. Die Zusammensetzung der variablen Region erfolgt durch zufällige Kombination verschiedener Gensegmente, so dass ca. 10^{13} verschiedene Spezifitäten für T-Zellrezeptoren und 10^{11} verschiedene Spezifitäten für B-Zellrezeptoren entstehen können (Nikolich-Zugich et al., 2004; Tze et al., 2005). Zudem ist das adaptive Immunsystem dazu in der Lage, Gedächtniszellen auszubilden, durch die eine erneute Infektion leichter und schneller bekämpft werden kann.

Des Weiteren ist auch das Komplementsystem ein Teil des Immunsystems. Es besteht aus verschiedenen Plasmaproteinen, die miteinander reagieren und sich gegenseitig aktivieren, um Krankheitserreger zu lysieren oder Entzündungsreaktionen auszulösen.

Die Zellen des Immunsystems haben ihren Ursprung im Knochenmark, in dem sich aus sogenannten pluripotenten Stammzellen zunächst lymphoide und myeloide Vorläuferzellen entwickeln. Aus lymphoiden Vorläuferzellen entwickeln sich unter anderem T- und B- Lymphozyten, die für die adaptive Immunität verantwortlich sind. Aus myeloiden Vorläuferzellen gehen verschiedene Typen der Leukozyten, Erythrozyten und Megakaryozyten hervor (Abb. 1.1). Die Selbsterneuerung und Differenzierung von Stammzellen werden auch durch die Stammzelle

umgebende Mikromilieu reguliert (Fuchs et al., 2004). Hierbei spielen Zytokine, Transkriptionsfaktoren, Adhäsionsmoleküle und die Interaktion der Stammzellen mit zellulären Faktoren und Matrixkomponenten des Knochenmarkstromas eine wichtige Rolle. Die Transkriptionsfaktoren Notch-1 (Stein et al., 2004; Calvi et al., 2003; Ohishi et al., 2002), Gata-2 (Stein et al., 2004; Zhu and Emerson, 2002) und HoxB4 (Klump et al., 2005; Stein et al., 2004; Zhu and Emerson 2002; Antonchuk et al., 2001) haben beispielsweise einen wichtigen Einfluß auf die gesteigerte Erhaltung und Selbsterneuerung der Stammzellen. Andere Transkriptionsfaktoren hingegen regulieren die Differenzierung der Stammzellen. So ist Gata-1 an der erythropoetischen und megakaryozytären Differenzierung beteiligt (Zhu and Emerson, 2002; Mueller et al., 2002; Terui et al., 2000), Pu.1 spielt eine Rolle bei der myelomonozytären und B-lymphatischen Differenzierung (Zhu and Emerson, 2002; Mueller et al., 2002) und CEBP α fördert die Ausbildung von Granulozyten (Zhu and Emerson, 2002).

Außer Transkriptionsfaktoren sind auch Zytokine an der Ausdifferenzierung der Vorläuferzellen beteiligt. Hierzu zählen sowohl die so genannten „Kolonien-stimulierenden Faktoren“ (-CSF) als auch Erythropoetin (EPO) und Thrombopoetin (TPO). EPO ist besonders für die Ausreifung von myeloiden Zellen zu Erythrozyten verantwortlich, während TPO die Entwicklung der Thrombozyten stimuliert. Des Weiteren sind auch der Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (G-CSF) und der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF) von Bedeutung bei der Entwicklung von Granulozyten, Makrophagen und Monozyten (Zhu and Emerson, 2002). Auch Adhäsionsmoleküle im Knochenmarkstroma können die Differenzierung der Stammzellen durch die Aktivierung intrazellulärer Signalwege oder die Modulation der Reaktion auf Wachstumsfaktoren beeinflussen.

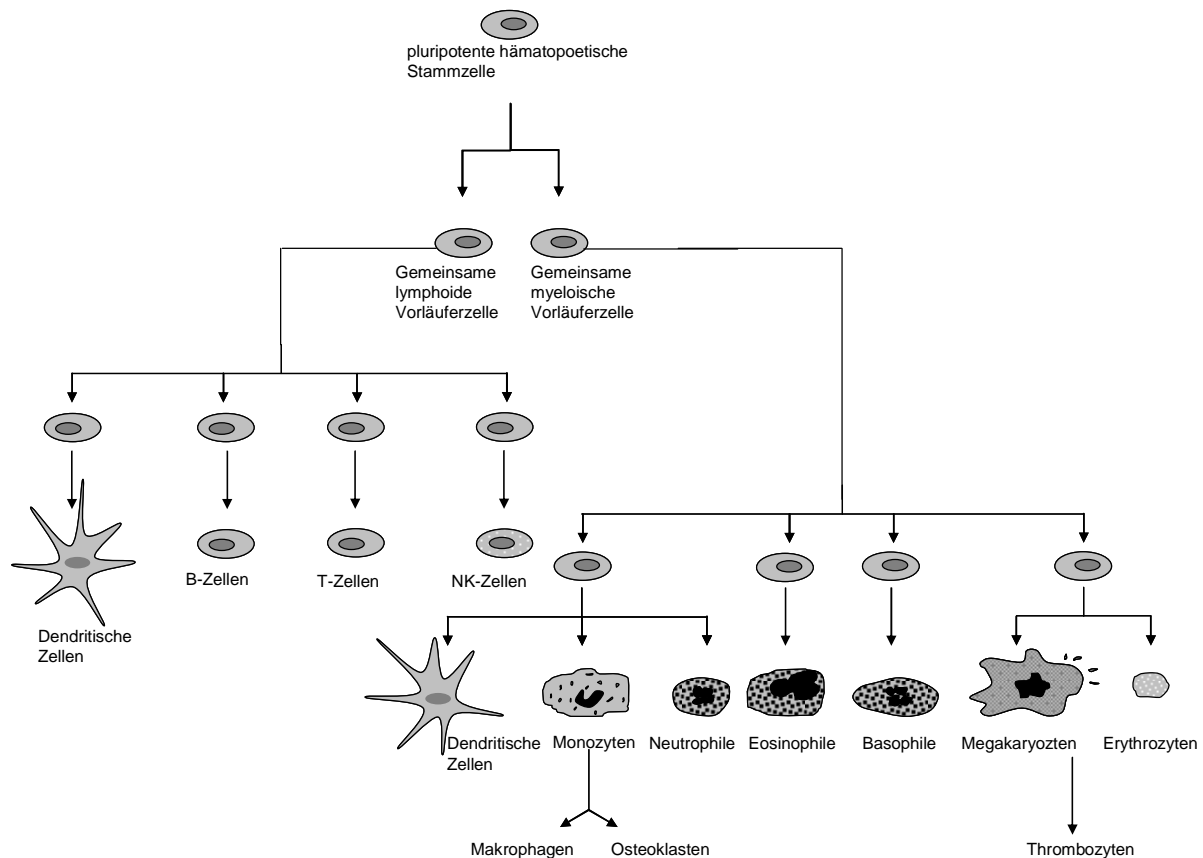


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Hämatopoese.

Aus einer pluripotenten Stammzelle entstehen zunächst lymphoide bzw. myeloide Vorläuferzellen. Die lymphoiden Vorläuferzellen entwickeln sich zu B- und T- Zellen sowie dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen (NK) während aus den myeloiden Vorläuferzellen unter anderem Granulozyten, Megakaryozyten und Erythrozyten entstehen.

1.2 T-Zellen und ihre Subpopulationen

Die Entwicklung der T-Zellen beginnt wie die aller Blutzellen im Knochenmark mit den T-Vorläuferzellen. Diese Zellen wandern zur weiteren Ausdifferenzierung in den Thymus ein und reifen hier zu T-Zellen aus. T-Zellen können über den T-Zell Rezeptor (TZR) Peptide (Antigene) erkennen, die von MHC-Molekülen (Major histocompatibility complex) präsentiert werden (Arstila et al., 1999). Im Kortex des Thymus findet zunächst die positive Selektion statt. Hierbei werden alle T-Zellen aussortiert, die körpereigene MHC-Komplexe nicht erkennen. In der Medulla des Thymus findet anschließend die negative Selektion statt. Medulläre Thymusepithelzellen präsentieren mit Hilfe der MHC-Moleküle körpereigene Peptide (Autoantigene). Alle T-Zellen die hierbei eine zu starke Avidität aufweisen, werden ebenfalls deletiert (Bommhardt et al., 2004; Stockinger, 1999; Kappler et al., 1987). Die Selektion von T-Zellen, die nicht auf Autoantigene reagieren, bezeichnet man als zentrale Toleranzinduktion. Durch diesen Mechanismus werden nicht alle Selbst-

reagierenden T-Zellen aussortiert, so dass ein zweiter Auswahlmechanismus, die periphere Toleranz, notwendig ist. Zur peripheren Toleranz zählen unter anderem die regulatorischen T-Zellen (Treg), auf die später näher eingegangen wird. Die MHC-Moleküle, mit deren Hilfe Antigene präsentiert werden, werden in zwei Klassen eingeteilt. MHC-Moleküle verschiedener Klassen werden hierbei von verschiedenen T-Zell-Subpopulationen, den $CD8^+$ - bzw. den $CD4^+$ - Zellen, erkannt. MHC-Moleküle der Klasse I werden von allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Sie werden zur Präsentation von intrazellulären Antigenen, die durch Prozessierung durch Proteasome entstehen, benötigt und hauptsächlich vom TZR der $CD8^+$ -Zellen erkannt. MHC-Moleküle der Klasse II hingegen werden von APZ (Antigen-präsentierenden Zellen, wie dendritische Zellen und Makrophagen) exprimiert. Sie präsentieren Peptide von extrazellulären Antigenen, die von den Zellen aufgenommen und endosomal durch Proteasen prozessiert werden. Diese MHC-Moleküle werden vornehmlich durch TZR der $CD4^+$ -Zellen erkannt. Für die Aktivierung einer naiven T-Zelle reicht die spezifische Bindung der TZR an den Peptid-MHC-Komplex jedoch nicht aus. Zusätzlich muß eine Bindung von kostimulatorischen Molekülen wie z. B. die Interaktion von CD28 auf T-Zellen mit B7-Liganden auf der Oberfläche von APZ stattfinden. Sind diese zwei Signale vorhanden, bewirken sie eine Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, die zur Zellproliferation und Ausdifferenzierung zu einer Effektorzelle sowie zur Produktion von Zytokinen führen (Fraser et al., 1991; Harding et al., 1992; Radvanyi et al., 1994).

Nach Interaktion mit aktivierten APZ reifen $CD8^+$ -Zellen zu zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL; „cytotoxic T-lymphocytes“) heran. Erkennen sie ihren spezifischen Peptid-MHC-Komplex, so setzen sie Perforine und Granzyme frei, die die Zellmembran der Zielzelle perforieren oder Apoptose induzieren. Hierdurch kann beispielsweise eine infizierte Zelle abgetötet werden und eine weitere Infektion gesunder Zellen verhindert werden.

$CD4^+$ -Zellen reifen zunächst zu naiven Effektor-T-Zellen oder natürlichen Treg-Zellen heran. Aus den naiven Effektorzellen können sich nun, je nach Zytokinprofil der APZ Th1-, Th2-, Th17- oder induzierte Treg-Zellen entwickeln (Th-Zelle = T-Helfer-Zelle). Hierbei wirkt ein Zytokin, das die Ausreifung einer Subpopulation begünstigt, hemmend auf die Ausreifung der anderen Subpopulationen.

Durch IL-12 und IFN- γ (Interferon- γ) wird die Ausreifung von Th-1-Zellen begünstigt. IFN- γ kann hierbei z. B. von NK-Zellen sezerniert werden (Scharton and Scott 1993). Th1-Zellen produzieren IFN- γ und IL-2 (Interleukin-2). Sie spielen beispielsweise eine wichtige Rolle in der Anti-Tumor-Immunität. Durch IFN- γ können Makrophagen aktiviert und zur Phagozytose von Pathogenen und deren Abtötung durch die Sekretion von antimikrobiellen Substanzen angeregt werden (Stenger et al., 1994; Agnello et al., 2003).

Th-2-Zellen hingegen werden durch das Zytokin IL-4 induziert. Sie sind besonders bei der Immunabwehr gegen Parasiten von Bedeutung, können B-Zellen aktivieren und produzieren vorwiegend IL-4, -5, -10 und -13 (Mosmann and Coffman, 1989; Romagnani, 1999; Santana and Rosenstein, 2003). Durch IL-4 und IL-5 können eosinophile Granulozyten rekrutiert werden, und IL-13 kann die Mastzellreaktion vermitteln (Weaver et al., 2007).

Durch eine Kombination der Zytokine TGF- β und IL-6 wird die Ausdifferenzierung von Th-17-Zellen induziert. Sie produzieren IL-17 und sind besonders bei der Immunabwehr gegen Mikroorganismen aktiv (Mangan et al., 2006; Bettelli et al., 2006; Lohr et al., 2006). Zusätzlich konnte auch die Produktion von Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) und IL-22 gezeigt werden (Infante-Duarte et al., 2000; Liang et al., 2006).

TGF- β und IL-2 begünstigen die Ausreifung von induzierten Treg-Zellen, die für die Immunsuppression von Bedeutung sind (Chen et al., 2003, Apostolou and von Boehmer, 2004; Kretschmer et al., 2005)(Abb. 1.2).

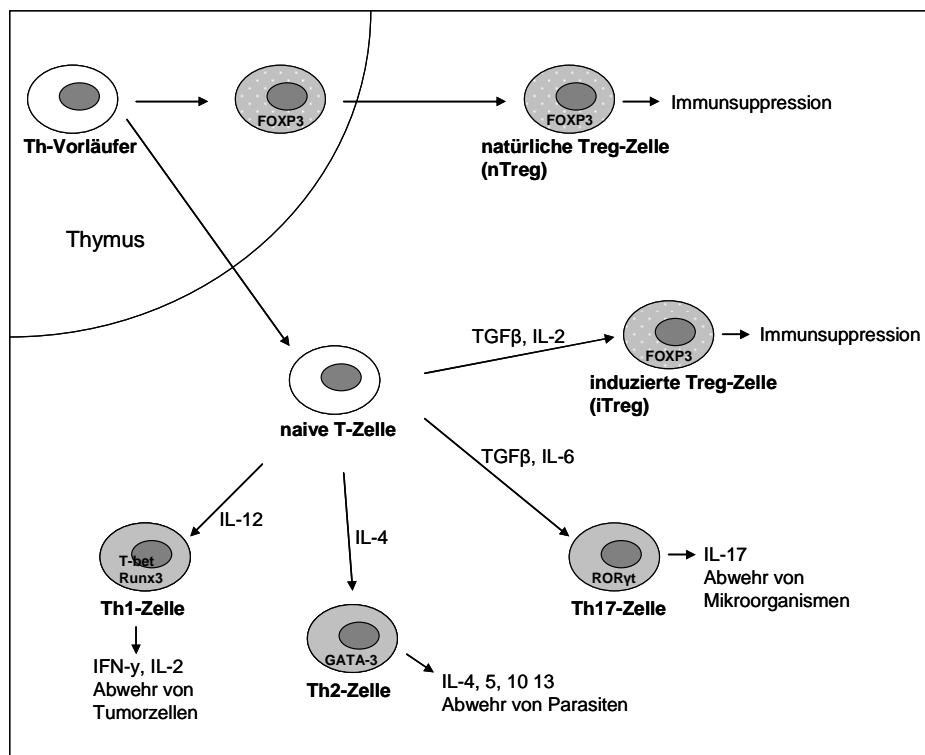


Abbildung 1.2: Differenzierung von Th-Vorläuferzellen in Treg oder Effektor-T-Zellen.

Im Thymus befindliche Th-Vorläuferzellen entwickeln sich zu natürlichen Treg-Zellen, die anschließend den Thymus verlassen, oder zu naiven T-Zellen, die weiter zu unterschiedlichen T-Effektorzellen ausdifferenzieren. Th= T-Helfer (verändert nach Sakaguchi et al., 2008).

1.3 Regulatorische T-Zellen (Treg)

Regulatorische T-Zellen (Treg) spielen eine wichtige Rolle, bei der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz. Wie schon erwähnt, handelt es sich hierbei um eine $CD4^+$ -T-Zell-Subpopulation, die sowohl aus im Thymus generierten natürlichen Treg als auch aus induzierten Treg-Zellen besteht. Die natürlichen Treg machen hierbei 2-5% der $CD4^+$ -Fraktion aus (Prabhala et al., 2006; Sakaguchi et al., 2004; Baecher-Allen et al., 2005; Beyer et al., 2006). Die Funktion der Treg ist die Kontrolle der Aktivierung und Funktion von Selbst- und Fremd-reaktiven T-Zellen in der Peripherie. Die ersten Artikel über Treg wurden bereits in den 1970er und 1980er Jahren veröffentlicht. Zu dieser Zeit wurde von der Entdeckung von sogenannten Suppressor-T-Zellen gesprochen. Um 1980 wurde die Popularität dieser Zellen geringer, da bislang keine spezifischen Marker für Suppressor-T-Zellen gemessen worden waren, was für eine Isolierung und weitere Analyse dieser Zellen notwendig war. Erst im Jahr 1995 fanden Sakaguchi et. al, dass die suppressive Aktivität der ab diesem Zeitpunkt als Treg bezeichneten Zellen mit einer hohen Expression von CD25, der α -Einheit des IL-2 Rezeptors, einherging (Sakaguchi et al., 1995). 2001 veröffentlichten Baecher-Allen et al. ihre Arbeit, in der sie darüber berichteten, dass

nur die CD25^{high} positiven Zellen im Gegensatz zu CD25^{low} und ^{medium} –T-Zellen suppressive Aktivität zeigten (Baecher-Allan et al., 2001). Ein Problem bestand allerdings darin, dass CD25 auch bei aktivierten T-Zellen hochreguliert war, so dass ein Treg-spezifischer Marker noch immer fehlte. Mit FOXP3 wurde schließlich ein Marker gefunden, der hauptsächlich bei CD25^{high}-Zellen zu finden war (Fontenot et al., 2005a; Fontenot et al., 2005b). Bis heute gilt FOXP3 vielfach als der beste Marker für Treg-Zellen. Besonders in neueren Arbeiten wird allerdings auch dieser Marker beim Menschen im Gegensatz zum Mausmodell, als nicht ausreichend für die Identifizierung von Treg beschrieben (Gavin et al., 2006; Walker et al., 2003; Tran et al., 2007).

Bislang sind drei Arten von Treg bekannt. Die im Thymus generierten CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺-Treg oder natürlichen Treg sowie die in der Peripherie induzierten Tr1- und Th3-Treg (Jonuleit et al., 2002), auf die hier nicht näher eingegangen wird, da sie nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind.

Durch ihre suppressive Wirkung auf T-Effektorzellen können Treg eine positive Wirkung haben und den Organismus vor verschiedenen Krankheiten schützen. So wirken Treg Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise Typ 1-Diabetes, bei dem speziell die Beta-Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas zerstört werden und somit ein Insulinmangel eintritt, entgegen (Sakaguchi et al., 2001; Shevach et al., 2006), oder sie limitieren Entzündungsreaktionen, welche unter anderem im Zusammenhang mit der IBD (inflammatory bowel disease), bei der es sich um eine rezidivierende entzündliche Erkrankung des Darms handelt, auftreten (Xystrakis et al., 2006; Coombes et al., 2005).

Andererseits können Treg aber auch negativen Einfluß nehmen und beispielsweise eine anti-Tumor-Immunität supprimieren (Curiel et al., 2004; Hansson et al., 2007), was sie zu einem wichtigen Forschungsthema in der Medizin macht.

1.3.1 Aktivierung und Proliferation von Treg

Natürlich vorkommende Treg verlassen den Thymus als eine funktionell aktive und differenzierte T-Zellpopulation (Seddon and Mason, 2000; Itoh et al., 1999). Sie sind bereits auf ihre immunsuppressive Funktion spezialisiert, bevor sie mit einem spezifischen Antigen in Kontakt kommen. Einmal aktiviert, sind Treg hoch effiziente, Antigen-unabhängige Suppressor-Zellen (Shevach 2002; Sakaguchi 2004). Nach *In-vitro*-TZR-Stimulierung und Kostimulation proliferieren sie allerdings nicht, sie sind

also anerg (Thornton et al., 2000; Shevach et al., 2001; Shevach et al., 2002). Diese Anergie kann *In-vitro* mit hohen Konzentrationen IL-2 überwunden werden (Earle et al., 2005; Godfrey et al., 2004; Tang et al., 2004). Zur Aktivierung benötigen Treg eine geringere Antigenkonzentration als naive T-Zellen (Takahashi et al., 1998), so können sie auch von unreifen dendritischen Zellen aktiviert werden, deren CD80- und CD86-Expression (Kostimulation bei der Aktivierung naiver T-Zellen) und anti-selbst-MHC-Komplexe zu wenig auf den Zelloberflächen exprimiert sind, um naive selbst-reagierende Zellen zu aktivieren, was den Treg die Möglichkeit gibt, selbst-reaktive T-Zellen zu supprimieren und so die periphere Toleranz aufrecht zu erhalten (Stephens et al., 2005). Entgegen ihrer Anergie *in vitro* konnten *in vivo* fortlaufend proliferierende Treg, vermutlich durch das Erkennen von Selbstantigenen, gefunden werden (Fisson et al., 2003; Setoguchi et al., 2005).

1.3.2 Phänotypische Charakterisierung von Treg

Die am besten charakterisierte Gruppe der Treg sind die im Thymus generierten natürlichen Treg-Zellen. Ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit war die Etablierung eines Mess-Protokolls, durch dessen phänotypische Charakterisierung die Erhebung verlässlicher Daten sichergestellt wurde. Die Expression von CD4 und die hohe Expression von CD25 sind die bislang gebräuchlichsten Marker, mit deren Hilfe Treg-Analysen durchgeführt werden. Ein Problem ist allerdings, dass der Phänotyp von Treg wie oben beschrieben dem der aktivierten T-Zellen ohne suppressive Eigenschaften sehr ähnlich ist, was eine genaue phänotypische Identifizierung und Isolierung dieser Zellen erschweren kann. Viele aktivierungsassoziierte Moleküle von T-Zellen wurden auch als Treg-Marker beschrieben. Dies gilt für CD25, die alpha-Kette des IL-2 Rezeptors, der Bestandteil eines hoch affinen IL-2 Rezeptors ist, sowie für das *cytotoxic T lymphocyte antigen-4* (CTLA-4), welches auf Effektor-T-Zellen nach deren Aktivierung hochreguliert wird, und dessen vermehrte Expression auf Treg durch FOXP3 induziert werden kann (Hori et al., 2003).

Zusätzlich wurden die zur TNFR Superfamilie zählenden Moleküle GITR (*glucocorticoid induced tumor necrosis factor (TNF) receptor*) und CD95 ebenfalls als Treg-Marker beschrieben. GITR wird jedoch auch bei naiven T-Zellen nach deren Aktivierung hochreguliert und kann als Kostimulator dienen (Tone et al., 2003). Szanya et al. (2002) und Ermann et al. (2005) beschreiben den Homingrezeptor CD62L als Möglichkeit zwischen Treg und aktivierten Effektorzellen zu

unterscheiden. In ihrer Arbeit konnten Ermann et al. (2005) zeigen, dass CD62L-positive Treg im Vergleich zu CD62L-negativen Treg vor akuter GVHD (Graft versus host disease) schützen konnten. 2005 unterschieden Koenen et al. zwischen CD27-positiven und CD27-negativen CD4⁺CD25^{high}-Zellen. In ihrer Arbeit beschrieben sie die negative Fraktion als weniger supprimierend und besser proliferierend als die positive, so dass die positive Fraktion eher den funktionellen Charakteristika der Treg entsprach. Eine Möglichkeit, Treg genauer von aktivierten T-Zellen abzugrenzen und somit eine Isolierung mit hoher Reinheit möglich zu machen beschreiben Hartigan-O'Connor et al. (2006) mit Hilfe des Markers CD127, der alpha-Kette des IL-7 Rezeptors. CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}-Zellen zeigten die für Treg typischen Charakteristika der Anergie *in vitro* und der suppressiven Aktivität. CD4⁺CD25^{high}CD127^{high}-Zellen hingegen zeigten diese Eigenschaften nicht. Ein Vorteil dieses Markers war auch die bessere optische Abgrenzbarkeit der CD127^{low}- gegen die CD127^{high}-Zellen am Durchflußzytometer. Mittlerweile sind bereits etablierte Isolierungs-Kits für die Verwendung eines FACS erhältlich, die auf den Markern CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} basieren. Als weitere Marker wurden die Chemokinrezeptoren CCR4 und CCR8 sowie HLA-DR^{low} beschrieben (Yi et al., 2006). In ihrer Arbeit aus dem Jahr 2007 konnten Deaglio et al. nachweisen, dass Treg mit Hilfe der Enzyme CD39 („ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1“) und CD73 („ecto-5'-nucleotidase“) Adenosin-Nukleoside generieren können, die Effektorfunktionen von T-Zellen blockieren.

Ein weiterer häufig verwendeter Marker ist der Transkriptionsfaktor FOXP3, der zur Familie der *forkhead/winged-helix* Transkriptionsfaktoren zählt. Beim Menschen wurde das IPEX-Syndrom (*X-linked syndrome of immunodysregulation, polyendocrinopathy and enteropathy*) mit funktionellen Mutationen im FOXP3-Gen in Verbindung gebracht. FOXP3 wirkt, in T-Zelllinien exprimiert, als Transkriptionsrepressor, der eine durch Aktivierung der Zellen induzierte Zytokinexpression inhibiert (Lopes et al., 2006). Naive CD4⁺CD25⁻-Zellen können durch die Expression von FOXP3 zu Treg konvertieren (Taams et al. 2002).

Eine zuverlässige Identifizierung der Treg durch Foxp3 ist bei der Maus sehr gut etabliert. Obwohl viele im Mausmodell gewonnene Erkenntnisse auf den Menschen übertragbar sind, gibt es gerade im Bezug auf FOXP3 hier wichtige Unterschiede, durch die Treg beim Menschen weniger leicht mittels FOXP3 identifiziert werden können als bei der Maus (Gavin et al., 2006; Walker et al., 2003; Tran et al., 2007).

Wie bereits besprochen tritt bei Mutationen im FOXP3-Gen ein starkes autoimmun-Syndrom (IPEX) beim Menschen auf. Auch bei der Maus konnte ein ähnliches Syndrom (scurfy) beobachtet werden. Beide Krankheitsbilder resultieren aus einer Treg-Defizienz (Hori et al., 2003) und damit einhergehenden Autoimmunerkrankungen. Obwohl die FOXP3-Gene in den unterschiedlichen Spezies eine starke Homologie aufweisen gibt es Unterschiede in ihrer Expression. Bei der Maus besteht eine gute Korrelation der Expression von CD25 und Foxp3. Allerdings sind 10% der CD25⁺-Zellen Foxp3 negativ. Hierbei handelt es sich vermutlich um aktivierte T-Zellen (Gavin et al., 2006). Beim Menschen sind nahezu alle CD4⁺CD25^{high}-Treg auch FOXP3 positiv. Es gibt aber einen variablen Prozentsatz von CD25^{medium}-Zellen, die ebenfalls FOXP3 positiv sind. Auch bei der Aktivierung von CD4⁺CD25⁻-Zellen wird FOXP3 hochreguliert, so dass eine Trennung von aktivierten T-Zellen und Treg-Zellen anhand von FOXP3 beim Menschen schwierig werden kann (Shimizu et al., 2002). Eine Hochregulierung von Foxp3 bei der Maus im Zuge einer T-Zellaktivierung findet nicht statt, so dass hier eine bessere Trennung von aktivierten T-Zellen und Treg möglich ist. Die beim Menschen durch Aktivierung induzierten FOXP3 positiven-Zellen zeigten keine Anergie oder Suppression. Nach längerer Kultur wurde FOXP3 wieder herunter reguliert. Es handelte sich also nicht um induzierte Treg (Gavin et al., 2006).

Um eine zuverlässige Identifizierung von Treg zu gewährleisten ist also beim Menschen weiterhin eine Kombination verschiedener Treg-Marker, wie beispielsweise CD4, CD25 und FOXP3, für eine Analyse dieser Zellen notwendig. Bei einer Isolierung ist FOXP3 allerdings nicht verwendbar, da es sich um einen intrazellulären Marker handelt.

Zwei weitere Marker, mit deren Hilfe Treg in naive und Memory-Zellen unterteilt werden können, sind CD45RA und CD45RO. Bei CD45 handelt es sich um eine membrandurchspannende Tyrosinphosphatase, die auf allen Leukozyten vorkommt. CD45 wird von verschiedenen Zelltypen in unterschiedlichen Isoformen exprimiert. Diese Isoformen bezeichnet man als CD45R und fügt an das Kürzel das Exon an, das das jeweilige Antikörperbindungsmuster hervorruft. CD45RA wird unter anderem auf T-Zellen exprimiert und zeichnet hierbei die naive Subpopulation aus. CD45RO hingegen ist auf Memory-T-Zellen zu finden.

Seddiki et al. (2006) untersuchten in ihrer Arbeit sowohl CD45RA- als auch CD45RO-positive Treg und fanden beide Fraktionen im peripheren Blut gesunder Spender.

Beide Populationen zeigten suppressive Fähigkeiten und waren FOXP3-positiv. Einen Unterschied fanden sie allerdings in der CD25-Expression. CD45RA-positive Treg waren schwächer CD25-positiv, als die Treg mit Memory Phänotyp. Die Autoren Seddiki et al. (2006) sahen hierin eine Erklärung dafür, dass bei Isolierungen mittels eines Durchflußzytometers kaum CD45RA-positive Treg erhalten wurden. Die für die Isolierung notwendigen Treg-Fenster waren meist dem $CD4^+CD25^{high}$ Phänotyp angepasst, so dass $CD45RA^+CD25^+$ Treg nicht mit isoliert wurden.

1.3.3 Isolierungsmöglichkeiten von Treg anhand ihres Phänotyps

Die Isolierung von Treg wird oft mit Hilfe der Marker $CD4^+CD25^{high}$ durchgeführt. Zunächst wurden hauptsächlich Methoden verwendet, die auf magnetischen Beads basierten. Beispielsweise isolierten Penna et al. (2005) die Treg in ihrer Arbeit in zwei Schritten. Sie verwendeten ein $CD4^+$ -Isolationskit der Firma Miltenyi, um die $CD4^+$ -Fraktion aus der mononukleären Zellfraktion zu isolieren und anschließend CD25-Beads um die CD25 positiven Zellen aus der $CD4^+$ -Fraktion zu erhalten. Eine andere Methode, um die Treg zu isolieren ist das Sortieren mittels eines präparativen Durchflußzytometers (FACS). Baecher-Allen et al. (2005) zeigten suppressive Aktivität bei durch ein solches FACS isolierten Treg. Die Fenster zur Isolierung der Treg wurden hierbei bei einer CD4 und CD25-Färbung auf die oberen 1-2% der $CD4^+$ -Zellen, also auf die $CD4^+CD25^{high}$ -Zellen, gesetzt. Zusätzlich verglichen Baecher-Allen et al. (2005) in ihrer Arbeit Treg, die mittels magnetischer Beads isoliert wurden und solche, die mittels eines FACS erhalten wurden. Es zeigte sich, dass über magnetische Beads isolierte Treg in funktionellen Tests zwar die für Treg typische *In-vitro*-Anergie auf einen unspezifischen Stimulus hin zeigten, eine suppressive Aktivität jedoch nicht nachzuweisen war. Bis heute wird sowohl die Isolierung mit magnetischen Beads als auch die mittels eines FACS durchgeführt. Dabei werden hauptsächlich die speziell zur Isolierung von Treg entwickelten Kits der Firmen Miltenyi (Hombach et al., 2007; Wolf et al., 2005; Mahic et al., 2006) und Dynal (Cosentino et al., 2007) verwendet. Andere Gruppen verwenden ein FACS (Elpek et al., 2007) oder eine kombinierte Methode aus beiden Techniken. Hierbei werden zunächst die $CD4^+$ -Zellen durch magnetische Beads isoliert und anschließend die Treg aus dieser Fraktion mittels des FACS aufgereinigt (Baecher-Allen et al., 2005; Karakhanova et al., 2006; Longhi et al., 2006; Condomines et al., 2006).

1.3.4 Suppressions-Mechanismen von Treg

Bislang ist die Funktionsweise der Treg nicht komplett aufgeklärt. Es sind allerdings vier mögliche Mechanismen der Suppression durch Treg in der Literatur beschrieben (Abb.1.3).

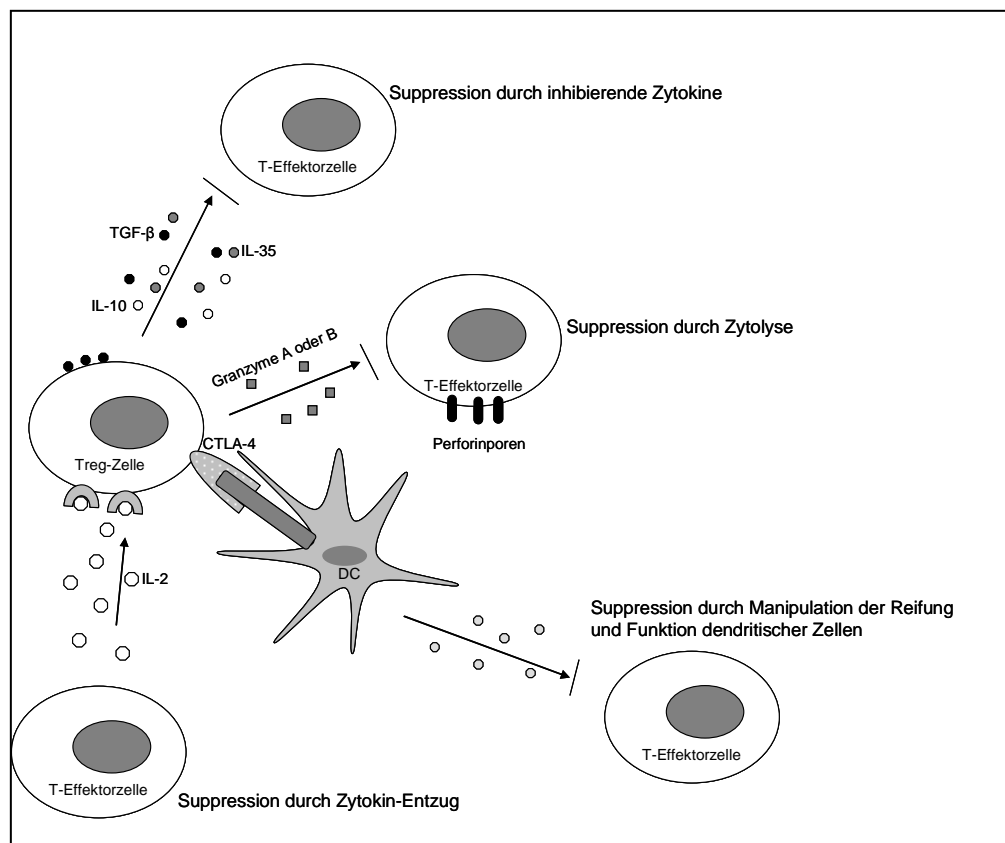


Abbildung 1.3: Mechanismen der Suppression von T-Effektorzellen durch Treg.

Die Suppression der Proliferation von T-Effektorzellen kann von Treg durch inhibierende Zytokine, Zytolyse, Manipulation der Reifung und Funktion dendritischer Zellen und/ oder durch Zytokin-Entzug erreicht werden.

Hierzu zählt zunächst der Zell-Zell-Kontakt, bei dem membranständiges TGF- β involviert zu sein scheint (Nakamura et al., 2001). Durch die Zugabe eines neutralisierenden anti-TGF- β -Antikörpers konnte die Inhibition der Proliferation der Effektor-T-Zellen aufgehoben werden (Li et al., 2006). Auch die Interaktion von auf Treg exprimiertem CTLA-4 und seinen von aktivierten T-Zellen exprimierten Liganden CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) scheint in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle zu spielen. Der genaue Mechanismus ist bislang allerdings noch unklar. Möglicherweise ist die Weiterleitung von inhibitorischen Signalen in die aktivierte CD4⁺-Zelle hierbei von Bedeutung (Bodor et al., 2007; Paust et al., 2004). In Experimenten mit neutralisierenden Antikörpern gegen CTLA-4 in Mäusen konnte gezeigt werden, dass im Fall der entzündlichen Kolitis die Interaktion von B7-

Molekülen auf aktivierten T-Zellen und CTLA-4 auf Treg ausschlaggebend für die Vermeidung einer Immunreaktion ist (Read et al., 2000). Andererseits konnten auch Treg von CTLA-4 knock out Mäusen entzündliche Kolitis kontrollieren, so dass die Bedeutung der B7:CTLA-4-Interaktion auf Treg noch unklar bleibt (Read et al., 2006). Ein weiteres wichtiges Molekül für die Suppression über Zell-Zell-Kontakt ist cAMP. In Lymphozyten konnte gezeigt werden, dass hohe cAMP-Konzentrationen nach Aktivierung des „inducible cAMP early repressor“ (ICER) die selektive Inhibition der Produktion von unter anderem IL-2 und IFN- γ verursachte (Bodor et al., 2000). Für Treg konnte bereits nachgewiesen werden, dass sie ihren Zielzellen durch „gap junctions“ cAMP zuführen (Bopp et al., 2007). Desweiteren konnte durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen gezeigt werden, wie Treg mit anderen T-Zellen „gap junctions“ bilden, durch die direkter Stoffaustausch stattfinden kann. Auch die Inhibition der Bildung von „gap junctions“ sowie die Abwesenheit von cAMP führte zum Verlust der suppressiven Funktion der Treg. Der genaue Mechanismus der Suppression durch cAMP ist bislang nicht geklärt. Es ist jedoch bekannt, dass die Bildung von IL-2 durch einen Überschuss an cAMP gehemmt werden kann (Novak et al., 1990).

Zielzellen für die Suppression oder Manipulation durch Treg über Zell-Zell-Kontakt können unter anderem auch dendritische Zellen sein. Tang et al. (2006) und Tadokoro et al. (2006) beobachteten bereits direkte Interaktionen zwischen Treg und dendritischen Zellen. Tadokoro et al. (2006) konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass Treg den Kontakt zwischen CD4⁺-T-Zellen und dendritischen Zellen inhibieren können. CTLA-4 scheint bei diesen Interaktionen ebenfalls von Bedeutung zu sein (Read et al., 2000). Durch das Blockieren von CTLA-4 wird die von Treg vermittelte Suppression durch dendritische Zellen schwächer (Oderup et al., 2006; Serra et al., 2003). Zudem fanden Chen (2004) und Curiel et al. (2003) das tumorassoziierte Treg PD-1 exprimieren, den Liganden zu B7-H1. Über die Rezeptor-Ligand-Bindung kann die IL-12 Produktion durch myeloide DZ und damit eine Immunantwort gehemmt werden.

Ein weiterer Mechanismus ist die Suppression durch inhibierende Zytokine wie TGF- β , IL-10 und IL-35. Obwohl Takahashi et al. (1998) und Thornton et al. (1998) diese Möglichkeiten zunächst ausschlossen, da sie in *In-vitro*-Versuchen keine Suppression durch Treg zeigen konnten, wenn eine permeable Membran Treg von

ihren Zielzellen trennte, und auch die Arbeit von Jonuleit et al. (2001) die Rolle der Zytokine eher nebensächlich bewertete, da durch das Blockieren der Zytokine eine Suppression durch Treg *In-vitro* nicht inhibiert wurde, wurden in *In-vivo*-Versuchen an Allergie- und Asthma-Modellen gezeigt, dass für die Treg vermittelte Suppression IL-10 (Hawrylowicz et al., 2005) bzw. IL-10 und TGF- β (Joetham et al., 2007) eine wichtige Rolle spielen. Weiterhin konnten Kursar et al. (2007), Jankovic et al. (2007) und Anderson et al. (2007) belegen, dass IL-10 bei verschiedenen Infektionen, bei denen auch Treg von Bedeutung sind, wichtig ist. Hierbei konnten die Treg allerdings nicht direkt mit IL-10 in Verbindung gebracht werden. Bei UV-induzierter Karzinogenese konnten Loser et al. (2007) zeigen, dass die IL-10-Produktion von Treg ein Bestandteil ist, um die anti-Tumor-Immunität zu blockieren. Es lässt sich also sagen, dass die Rolle von IL-10 bei der Suppression durch Treg bislang je nach Zielorganismus bzw. Krankheit und Experiment anders zu sein scheint. Auch für die Rolle von TGF- β in diesem Zusammenhang gibt es widersprüchliche Literatur. Li et al. (2007a) beschrieben in ihrer Arbeit, dass von Treg produziertes TGF- β bei der Limitierung der Anti-Tumor-Aktivität durch Zytokin-induzierte Killerzellen von Bedeutung ist. Desweiteren fanden Nakamura et al. (2001), dass membrangebundenes TGF- β für die Suppression verantwortlich sein könnte. Dieses Ergebnis konnte allerdings bislang durch Studien mit TGF- β -Blockern noch nicht bestätigt werden (Piccirillo et al., 2002). Neu beschrieben ist IL-35 als inhibierendes Zytokin (Collison et al., 2007). Es gibt auch hier Hinweise auf einen Zusammenhang mit Treg-Suppression.

Der dritte Mechanismus der Suppression durch Treg ist die Zytolyse der Zielzellen. Diesen Mechanismus findet man besonders bei NK-Zellen oder CD8⁺-zytotoxischen T-Zellen. Cao et al. (2007) zeigten, dass Treg mit Hilfe von Granzym B und Perforin NK-Zellen und CTL supprimieren und somit die anti-Tumor-Antwort schwächen. Desweiteren beschrieben Garin et al. (2007) Galectin-1 als Bestandteil eines Suppressionsmechanismus der Treg. Galectin-1 kann bei T-Zellen Apoptose induzieren und ist bei Treg hochreguliert. Galectin-1 defiziente Treg zeigten eine verminderte suppressive Aktivität.

Der vierte Mechanismus ist die Suppression durch Zytokin-Entzug. Durch die starke Expression von CD25 können Treg aktiv sich teilenden T-Effektorzellen IL-2

entziehen und diese Zellen so supprimieren (de la Rosa et al., 2004). Andererseits wurde von Oberle et al. (2007) beschrieben, dass es nicht möglich ist, eine T-Effektorzelle allein durch den Entzug von IL-2 zu supprimieren.

Eine zusätzliche Möglichkeit der Suppression durch Treg beschreiben Deaglio et al. (2007). In ihrer Arbeit zeigen sie, dass Treg die Oberflächenmoleküle CD39 und CD73 exprimieren. Mit Hilfe dieser Moleküle sind Treg in der Lage Adenosin zu generieren, was als Inhibitor von T-Zell-Antworten bekannt ist (Huang et al., 1997). Adenosin kann über den Adenosin-A2A-Rezeptor auf konventionelle CD4⁺-T-Zellen wirken und sie so supprimieren.

Abschließend lässt sich sagen, dass keiner dieser Mechanismen allein für die supprimierende Wirkung der Treg verantwortlich zu sein scheint, da beim Blockieren eines jeden Mechanismus die suppressive Aktivität der Treg nicht komplett verschwand. Möglicherweise verfügen Treg über mehrere Mechanismen oder es gibt mehrere Arten von Treg, die sich in ihren Suppressionsmechanismen unterscheiden.

1.3.5 Treg bei soliden Tumorerkrankungen

Zu Beginn dieser Arbeit waren bereits einige Artikel veröffentlicht, die sich mit der Frequenz von Treg im peripheren Blut oder in der Tumorumgebung von an soliden Tumoren erkrankten Patienten beschäftigten. Bereits 2001 zeigten Woo et al. erhöhte Treg-Prozentzahlen innerhalb der CD4⁺-Populationen in der Tumorumgebung bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom und Ovarialkarzinom. Bei einer späteren Analyse der so gefundenen Treg wurde suppressive Aktivität festgestellt (Woo et al., 2002). Liyanage et al. (2002) fanden erhöhte Treg Zahlen auch im peripheren Blut von Patienten mit Brust- und Bauchspeicheldrüsenkrebs. Auch bei weiteren soliden Tumorerkrankungen wie beim malignen Melanom wurde eine Erhöhung der relativen Treg-Zahlen bestätigt (Javala and Rosenberg, 2003). Eine Untersuchung der FOXP3 RNA bei dieser Erkrankung ergab einen erhöhten Prozentsatz (Viguer et al., 2004). Eine hohe Treg-Zahl wurde 2003 in verschiedenen Arbeiten bei Patienten mit Magenkrebs mit einer schlechten Prognose und schlechteren Überlebensraten korreliert (Sasada et al., 2003; Ichihara et al., 2003). Es konnte beobachtet werden, dass die Treg-Zahlen bei einer Verbesserung des Gesundheitszustandes wieder zurückgingen und sich bei einem

Rezidiv wieder erhöhten (Kono et al., 2006). Auch in anderen Arbeiten konnte ein Zusammenhang zwischen Tumorwachstum und der Frequenz der Treg hergestellt werden. Curiel et al. (2004) zeigten in ihrer Arbeit eine supprimierende Wirkung der Treg auf tumorspezifische T-Zellen beim Ovarialkarzinom. Es konnte beobachtet werden, dass Treg besonders in Tumornähe lokalisiert waren, sich aber auch in späteren Krankheitsstadien nicht im Lymphknoten befanden. Eine Erklärung für die Affinität der Treg für Tumore war die Entdeckung, dass Tumorzellen und Makrophagen in der Tumorumgebung CCL22 produzierten und Treg so über CCR4 zum Tumor leiteten. Mit Hilfe der Treg ist der Tumor also in der Lage, sich vor dem Immunsystem zu schützen. 2005 wurde auch beim Plattenepithelkarzinom und beim Leberzellkarzinom eine erhöhte Prozentzahl Treg gefunden (Schaefer et al., 2005; Ormandy et al., 2005).

Ein wichtiges Beispiel für eine solide Tumorerkrankung, zu der es bereits einige Literatur zu Beginn dieser Arbeit gab, ist das Bronchialkarzinom. Proben von Patienten mit dieser Erkrankung wurden in der vorliegenden Arbeit als Vergleichsmaterial zu Proben von an Multiplem Myelom erkrankten Patienten verwendet. Deshalb soll diese Erkrankung im Folgenden kurz vorgestellt werden:

Das Bronchialkarzinom ist mit 25% aller Karzinome in Europa und den USA die häufigste bösartige Tumorerkrankung (Landis et al., 1999). Die Ursachen für die Entwicklung von Bronchialkarzinomen werden in exogene und endogene Faktoren unterteilt, wobei die exogenen Faktoren wie das Rauchen überwiegen (Toh et al., 2004). Wichtige endogene Faktoren sind beispielsweise genetische Dispositionen oder die verringerte Aktivität der DNA-Reparaturenzyme (Sekido et al., 2003).

Die Einteilung der Bronchialkarzinome erfolgt nach der 3. WHO-Klassifikation von 1999 in zwei Gruppen: Die kleinzelligen Bronchialkarzinome (SCLC) und die nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome (NSCLC), die wiederum in die Untergruppen Adenokarzinom, Plattenepithelkarzinom und großzelliges Karzinom unterteilt werden können (Braunwald et al., 2001; Travis et al., 1995).

Das SCLC geht von neuroendokrinen Zellen aus. Es siedelt sich zentral in der Lunge an, und es kommt häufig schon in frühen Stadien zur lymphogenen und hämatogenen Metastasierung (Rosti et al., 2006; Raz et al., 2006). Auch bei dem NSCLC sind frühe Metastasierungen häufig. Das Adenokarzinom und das Plattenepithelkarzinom gehen aus schleimproduzierenden Zellen oft durch chronische Schleimhautreizungen hervor. Bei dem großzelligen Karzinom handelt es

sich hingegen um eine entdifferenzierte Form des Adeno- oder Plattenepithelkarzinoms. Es zeichnet sich besonders durch seine großen Zellen aus, die über sehr große Zellkerne und viel Zytoplasma verfügen (Subramanian and Govindan, 2007; Travis and Travis 1995).

Für solide Tumore im Allgemeinen und auch für das Bronchialkarzinom im Speziellen wurden bereits mehrere Arbeiten veröffentlicht, die eine erhöhte Treg Frequenz in der Tumorumgebung und im peripheren Blut der Patienten zeigten. Wie bereits erwähnt fanden Woo et al. (2001) als eine der ersten Arbeitsgruppen eine erhöhte Treg Frequenz in der Tumorumgebung von Bronchialkarzinompatienten. Sie konnten zusätzlich nachweisen, dass diese Zellen TGF- β produzierten. 2002 untersuchten sie diese Treg Zellen bei Bronchialkarzinompatienten erneut und fanden eine hohe Expression von CTLA-4. Eine erhöhte Treg Prozentzahl fanden sie nun auch im peripheren Blut. Desweiteren zeigten sich Hinweise auf eine negative Beeinflussung der anti-Tumor Antwort durch die Treg. 2003 untersuchten Wolf et al. Treg bei Bronchialkarzinompatienten und fanden ebenfalls eine signifikant erhöhte Frequenz im peripheren Blut beim Vergleich mit normalen Spendern. Wolf et al. (2003) führten funktionelle Tests durch und zeigten die für Treg typische Anergie und auch die suppressive Aktivität dieser Zellen. Diese Angaben bestätigten auch Okita et al. (2005) in ihrer Arbeit, in der auch sie signifikant erhöhte Treg-Werte im peripheren Blut von Bronchialkarzinompatienten fanden.

In dieser Arbeit wurden Proben von Bronchialkarzinompatienten verwendet, um diese Ergebnisse zu reproduzieren, und somit die Messmethode zu validieren. Außerdem dienten die so gewonnenen Daten als Vergleichsmaterial für die Messungen bei Patienten mit Multiplem Myelom.

1.3.6 Treg bei hämatologischen Erkrankungen

Für solide Tumorerkrankungen zeichnet sich also eine Erhöhung der Treg-Prozentzahlen ab. Diese scheint mit dem Stadium der Erkrankung zu korrelieren und wirkt sich negativ auf die Anti-Tumor-Immunität aus.

Eine solch präzise Aussage ist bislang für hämatologische Erkrankungen nicht möglich. Zu Beginn dieser Arbeit waren zu diesem Thema nur sehr wenige Arbeiten veröffentlicht und auch im Verlauf der Arbeit wurden weiterhin widersprüchliche Aussagen zur Frequenz und Funktionalität von Treg bei hämatologischen Erkrankungen getroffen. Eine der ersten Studien zu regulatorischen T-Zellen bei

hämatologischen Erkrankungen wurde 2004 von Marshall et al. veröffentlicht. Hierbei wurde im peripheren Blut von Patienten mit Hodgkin-Lymphom eine große IL-10-sekretierende Population von Tr1-Zellen und auch CD4⁺CD25⁺ Treg gefunden. Diese Zellen wiesen supprimierende Aktivität auf. Bei Patienten mit chronischer lymphatischer B-Zell-Leukämie konnten Beyer et al. (2005) eine Stadium-abhängige Erhöhung der Treg nachweisen. Auch diese Zellen wiesen supprimierende Fähigkeiten auf. Bei weiteren hämatologischen Erkrankungen wie dem B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom oder der akuten myeloischen Leukämie konnte ebenfalls eine Erhöhung der Treg-Zahl gefunden werden, die mit dem Stadium der Krankheit korrelierte (Motta et al., 2005; Yang et al., 2006; Wang et al., 2005). Im Gegensatz dazu fanden Carreras et al. (2006) bei Patienten mit follikulärem Lymphom Proben mit erhöhter Treg-Zahl, aber auch Proben mit zu normalen Spendern vergleichbaren und niedrigeren Treg-Zahlen. Auch Alvaro et al. (2005) fanden im Lymphknoten und in der Umgebung des Lymphknotens von Hodgkin-Lymphom-Patienten nur eine sehr geringe Anzahl Treg. Eine der neuesten Studien, die sich mit Treg bei hämatologischen Erkrankungen befassen, beschäftigt sich mit der Frage nach dem Einfluß von erhöhten Treg-Zahlen auf den Verlauf der Krankheit. Tzankov et al. (2008) sprechen hierbei von einem positiven Effekt der Treg auf das Überleben der Patienten mit follikulärem Lymphom, B-Zell-Lymphom und dem klassischen Hodgkin-Lymphom.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei soliden Tumoren grundsätzlich eine erhöhte Treg-Zahl gefunden wurde, bei hämatologischen Erkrankungen hingegen widersprüchliche Ergebnisse vorliegen, die weitere Untersuchungen erforderlich machen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung von Treg beim Multiplen Myelom, das im Folgenden näher erläutert werden soll.

1.3.6.1 Das Multiple Myelom

Beim Multiplen Myelom (MM) handelt es sich um eine hämatologische Tumorerkrankung, die nach der WHO-Klassifizierung den malignen Lymphomen der B-Zellreihe zugeordnet wird. Die transformierten malignen Plasmazellen entziehen sich regulären Apoptose-Mechanismen. Diese klonale Zellpopulation produziert meist ein komplettes monoklonales Immunglobulin (Paraprotein) vom Typ IgG oder IgA, seltener IgM oder IgD, oder nur Immunglobulin-Leichtketten vom Typ κ oder λ (Bence-Jonson-Protein). Bei 2-3% der Patienten handelt es sich um ein asekretorisches MM,

das heißt es wird kein monoklonales Immunglobulin gebildet (Bataille and Harousseau, 1997). Antigen wirkende Epitope in dem variablen Fragment von Immunglobulinen, die von den Tumorzellen exprimiert werden, werden als Idiotyp (Id) bezeichnet. Da es sich beim Multiplen Myelom um eine klonale Erkrankung der B-Zell-Reihe handelt, exprimieren die Tumorzellen alle einen identischen Antikörper auf ihrer Oberfläche. Der Idiotyp des Paraproteins kann als tumorspezifisches Antigen, welches vom malignen B-Zell-Klon exprimiert wird, bezeichnet werden.

Durch die Akkumulation der Tumorzellen im Knochenmark kann es zu Anämien, Knochendestruktionen und erhöhten Calcium-Werten kommen. Durch Mutationen der Gene, die für die Immunglobulinproduktion zuständig sind kommt es zur Expression von Paraproteinen, deren Aminosäuresequenz und Proteinstruktur nicht mehr denen von normalen Immunglobulinen entsprechen. Diese Paraproteine erfüllen die normale Immunglobulinfunktion nicht mehr. Durch die Abgabe des Paraproteins ins Blut werden das Plasmavolumen und die Viskosität erhöht, wodurch es zu Niereninsuffizienz kommen kann. Zusätzlich wird die normale Immunglobulinproduktion gestört, was Infektionen zur Folge haben kann (Durie, 2001). Eine Einteilung des MM in drei Stadien erfolgt anhand klinischer Parameter und ist in Tabelle 1.1 aufgeführt.

Tabelle 1.1: MM-Stadien nach Durie and Salmon, 1975.

Die unten aufgeführten Stadien werden durch die Zusätze A= normale Nierenfunktion (Serumkreatinin <2mg/dl) bzw. B= eingeschränkte Nierenfunktion (Serumkreatinin >2mg/dl) ergänzt.

Stadium	Kriterien
Stadium I	Alle folgenden Kriterien müssen erfüllt sein: <ul style="list-style-type: none"> • Hämoglobin >10g/dl • Serum Calcium im Normbereich (<12mg/dl) • Radiologisch normale Knochenstruktur oder solitäres Plasmozytom • Niedriges Paraprotein (IgG<5g/dl; IgA<3g/dl; Bence Jone-Protein im Harn<4g/24h)
Stadium II	Weder Stadium I noch Stadium III ist zutreffend
Stadium III	Mindestens eines der folgenden Kriterien muss erfüllt sein: <ul style="list-style-type: none"> • Hämoglobin <8,5g/dl • Erhöhtes Serum-Calcium (>12mg/dl) • Radiologisch fortgeschrittene osteolytische Knochenläsionen

	<ul style="list-style-type: none"> • Hohes Paraprotein (IgG> 7g/dl; IgA> 5g/dl; Bence Jones-Protein im Harn> 12g/24h)
--	---

Das mediane Alter der an MM erkrankten Personen ist 65 Jahre, wobei es eine Tendenz zu jüngeren Patienten unter 55 Jahren gibt (Tricot, 2000). Ein MM entwickelt sich meist aus einem altersabhängigen prä-malignen Tumor, der MGUS (monoclonal gammopathy of undetermined significance). MGUS und MM bilden das gleiche monoklonale Immunglobulin (Id). Im Gegensatz zum MGUS weist das MM die größere Tumormasse auf und umfasst Symptome wie Knochendestruktion, Anämie und Immundefizienz (Kuehl and Bergsagel, 2002).

Zelluläre Immundefekte beim MM

Das MM bringt häufig einige zelluläre Immundefekte mit sich, wie die Erniedrigung von CD19⁺, CD4⁺ und CD8⁺-Zellen, die negativ mit dem Überleben der Patienten korreliert. Es ist also ein Zusammenhang zwischen dem Fortschreiten der Krankheit und einem gestörten Immunsystem zu erkennen (Kay et al., 1997, 1998, 2001). Auch bei hämatopoetischer Stammzelltransplantation ist zu sehen, dass die Dosierung der transplantierten Lymphozyten positiv mit der Verbesserung der Krankheit korreliert (Porrata et al., 2001, 2004). Dendritische Zellen, die zu den antigenpräsentierenden Zellen gehören, spielen in diesem Zusammenhang ebenfalls eine wichtige Rolle. Sie sind bei der Aktivierung der Antigen-Antwort von Bedeutung und bei MM-Patienten häufig nicht voll funktionell, was zu Störungen bei Immunantworten führt (Brimnes et al., 2006, Brown et al., 2004). Bei MM-Patienten treten außerdem T-Zelldysfunktionen in Anzahl und Funktion auf, wie beispielsweise die Inversion des CD4⁺:CD8⁺-Verhältnis (Mills and Cawley, 1983) oder das gestörte Th1/Th2 CD4⁺-Zellverhältnis (Ogawara et al., 2005). Die T-Zellantwort, die den Organismus vor Infektionen schützt, ist funktionell gestört (Bianchi et al., 1997; Brown et al., 1998; Frassanito et al., 2001).

Therapien beim MM

Zu den konventionellen Therapien zählen Behandlungen mit Medikamenten wie Melphalan oder Cyclophosphamid und/oder Glucocorticoiden wie beispielsweise Dexamethason sowie Anti-Tubulin Medikamenten wie Vincristine. Weitere Medikamente sind Thalidomid, Lenalidomid und Velcade (Anderson et al., 2000,

Thierry et al., 2007; Dimopoulos et al., 2007). Bei systematischem MM wird oft eine Hochdosis-Chemotherapie oder wenn dies keine Option ist eine konventionelle Chemotherapie angewandt (Ludwig, 2005).

Eine neuere experimentelle Variante der Therapie ist die Anti-Tumor-Vakzination, bei der es verschiedene Formen gibt. Eine wichtige Form ist die Vakzinierung unter Verwendung von DZs. DZ nehmen durch Phagozytose Antigene aus ihrer Umgebung auf und präsentieren sie T-Zellen. Es wird eine klonale T-Zell-Expansion und Differenzierung in Effektor- und Memory-Zellen induziert (Harrison and Cook, 2005; Ruffini et al., 2002). Bei einer Anti-Tumor-Vakzination werden DZ nun beispielsweise mit Tumorzellen, Tumorzelllysate oder Id-Protein „gefüttert“ bzw. mit Peptiden beladen (Harrison and Cook, 2005; Anderson et al., 2000). Im Universitätsklinikum Essen wurden für eine solche Vakzination DZ aus monozytären peripheren Vorläuferzellen ausdifferenziert, in den unterschiedlichen Reifungsstadien mit Hilfe eines Durchflußzytometers charakterisiert und schließlich mit Idiotypprotein beladen. Bei der Ausführung einer solchen Vakzination gibt es bislang noch Probleme (Rosenberg, 2004). Da Treg einen negativen Einfluß auf Anti-Tumor-Antworten haben können, sind diese Zellen hier vielleicht störend (Curiel et al., 2004).

1.3.6.2 Treg beim Multiplen Myelom

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit waren keine Daten zu Treg beim Multiplen Myelom veröffentlicht. Diese Arbeit sollte daher einen Beitrag zur Aufklärung der Rolle dieser Zellen bei an MM erkrankten Personen leisten, um langfristig durch gezielte Manipulation der Treg eventuell eine Verbesserung der Therapien zu erreichen.

Im Laufe der Arbeit wurden einige divergente Artikel zu diesem Thema veröffentlicht, auf die in der Diskussion näher eingegangen wird.

1.4 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten Daten über Treg beim Multiplen Myelom erhoben werden und somit Informationen über die Treg-Situation bei hämatologischen Erkrankungen gesammelt werden, die bislang in der Literatur noch widersprüchlich sind. Hierzu sollten folgende Aufgaben bearbeitet werden:

- Es sollte ein Vergleich der Treg Prozent- und Absolutwerte bei normalen Spendern und MM-Patienten stattfinden.
- Des Weiteren sollte die Auswirkung einer Chemotherapie und verschiedener Krankheitsparameter auf die Treg-Zahl im peripheren Blut und Knochenmark untersucht werden.
- Bei zwei MM-Patienten sollte die Auswirkung einer Vakzine aus Id-beladenen dendritischen Zellen auf die Treg-Werte beobachtet werden.
- Um Treg von MM-Patienten funktionell testen zu können, sollte ein Verfahren etabliert werden, um diese Zellen aus geringen Mengen Blut zu isolieren. Hierbei sollten mehrere Methoden vergleichend getestet werden.
- Um auch weitergehende Analysen der Treg möglich zu machen sollte eine Methode zur Expansion von Treg im Labor der Arbeitsgruppe etabliert werden.
- Abschließend sollte eine Methode im eigenen Labor etabliert werden, um die suppressive Aktivität der Treg zu testen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

BSA (p.a.)	Fluka Biochemica, Schweiz
DMSO (p.a.)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA (p.a.)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BD Pharm Lyse Lysing Buffer (p.a.)	BD Biosciences, Heidelberg
Ficoll-Paque Plus (p.a.)	Amersham Biosciences, Freiburg
Lymphoprep (p.a.)	Axis Shield, Dänemark
FKS (p.a.)	Life Technologies, Eggenstein
Flow-Count Fluorespheres (p.a.)	Beckman Coulter, Krefeld
PBS -/- (p.a.)	Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA
Sodium Azide, research grade	Serva, Heidelberg
Liquemin N 25 000 (p.a.)	Roche, Grenzach-Wyhlen
Trypanblau (0,4%) (p.a.)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin/EDTA (p.a.)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aqua ad Injectabilia (p.a.)	Fresenius, Bad Homburg

2.1.2 Zellkulturmedien und Zusätze

RPMI 1640	Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA
L-Glutamin (200 mM)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.1.3 Kits

Dynabeads Human Treg Expander	Dynal, Karlsruhe
Dynal CD4+CD25+ Treg Kit	Dynal, Karlsruhe
CD4+CD25+ Regulatory T Cell Isolation Kit Human	Macs; Miltenyi, Bergisch Gladbach

PE anti-human Foxp3 Staining Set

NatuTec, Frankfurt am Main

2.1.4 Antikörper

Mouse-Anti-human CD3-PE (Klon UCHT1)	Beckman Coulter, Krefeld
Mouse-Anti-human CD3-ECD (Klon UCHT1)	Beckman Coulter, Krefeld
Mouse-Anti-human CD3 (Klon UCHT1)	Beckman Coulter, Krefeld
Mouse-Anti-human CD4-FITC (Klon 13B8.2)	Beckman Coulter, Krefeld
Mouse-Anti-human CD4-PC5 (Klon 13B8.2)	Beckman Coulter, Krefeld
Mouse-Anti-human CD4-ECD (Klon 13B8.2)	Beckman Coulter, Krefeld
Mouse-Anti-human CD8-FITC (Klon B9.11)	Beckman Coulter, Krefeld
Mouse-Anti-human CD8-PC5 (Klon B9.11)	Beckman Coulter, Krefeld
Mouse-Anti-human CD25-PE (Klon B1.49.9)	Beckman Coulter, Krefeld
Mouse-Anti-human CD25-PE (Klon 4 E3)	Macs; Miltenyi, Bergisch Gladbach
Mouse-Anti-human CD25-PC5 (Klon B1.49.9)	Beckman Coulter, Krefeld
Mouse-Anti-human CD27-PC5 (Klon 1A4-CD27)	Beckman Coulter, Krefeld
Mouse-Anti-human CD27-PE (Klon 1A4-CD27)	Beckman Coulter, Krefeld
Mouse-Anti-human CD28 (Klon CD28.2)	Beckman Coulter, Krefeld
Mouse-Anti-human CD45RA-FITC (Klon ALB11)	Beckman Coulter, Krefeld
Mouse-Anti-human CD45RA-PE (Klon ALB11)	Beckman Coulter, Krefeld
Mouse-Anti-human CD45RO-FITC (Klon UCHL1)	Beckman Coulter, Krefeld
Mouse-Anti-human CD45RO-ECD (Klon UCHL1)	Beckman Coulter, Krefeld
Mouse-Anti-human CD62L-FITC (Klon DREG56)	Beckman Coulter, Krefeld
Mouse-Anti-human CD62L-ECD (Klon DREG56)	Beckman Coulter, Krefeld
Mouse-Anti-human CD85j-PE (Klon GHI/75)	BD Pharmingen, Heidelberg

Mouse-Anti-human CD127-PE	Beckman Coulter, Krefeld
Mouse-Anti-human CD152-PE (CTLA-4) (Klon BNI3)	Beckman Coulter, Krefeld
Rat-Anti-human Foxp3-PE	NatuTec, Frankfurt am Main

2.1.5 Wachstumsfaktoren

Proleukin (IL-2)	Chiron, Tuttlingen
------------------	--------------------

2.1.6 Puffer und weitere Lösungen

Einfriermedium	50% FKS 10% DMSO In RPMI 1640
Waschpuffer Dynal	0,1% BSA in PBS
Waschpuffer Miltenyi	0,5% BSA 2 mM EDTA in PBS
Facspuffer	1% BSA 0,01% NaN ₃ In PBS

2.1.7 Geräte

CO ₂ -Inkubator NU 2700 E	NUAIRE, Plymouth, USA
Durchflußzytometer EPICS XL	Coulter Electronics, Krefeld
FACS Vantage, Laser Coherent, 0.4W	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Neubauer Zählkammer	GLW, Würzburg
Gefrierschrank –80°C, ULT 2186-7-Ultima 12	REVCO, Asheville
Gilson-Pipetten	Villers-le-Bel, Frankreich
Knick pH-Meter 761, Calimatic	Ingold Messtechnik, Steinbach

Nalgene Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene, Rochester, NY, USA
Phasenkontrastinversionsmikroskop CK2	Olympus Optical Co., Hamburg
pipetus-standard, P990 30 01	Hirschmann, Eberstadt
pipetus-akku, P 990 7001/0294	Hirschmann, Eberstadt
Sicherheitswerkbank NU4400-600E	NUAIRE, Plymouth, USA
Vortexer L46	GLW, Würzburg
Wasserbad TWB 22	Julabo, Seelbach
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge EBA 12 R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Zentrifuge GS-6R	Beckman Instruments, München
Zentrifuge J2-21	Beckman Instruments, München
Zentrifuge TJ-6	Beckman Instruments, München

2.1.8 Primäre Zellen

Buffy-Coat-Präparate	Universitätsklinikum Essen
Buffy-Coat-Präparate	Universitätsklinikum Düsseldorf

2.1.9 Normale Spender

Von normalen Spendern wurden jeweils 20-30 ml peripheres Blut (PB) für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche entnommen.

Spender Nr.	Geschlecht	Alter	Verwendete Proben
1020	weiblich	54	PB
1016	weiblich	47	PB
1024	weiblich	23	PB
1015	weiblich	keine Angaben	PB
1018	männlich	keine Angaben	PB
1019	weiblich	53	PB
1002	weiblich	27	PB
1022	weiblich	36	PB
1025	weiblich	21	PB
1021	weiblich	40	PB
1023	männlich	32	PB

2.1.10 Patientenproben Multiples Myelom (MM)

Die in dieser Arbeit erwähnte Immuntherapiestudie sowie die durchgeführten Treg-Analysen wurden von der lokalen Ethikkommission geprüft und genehmigt. Bezüglich der durchgeführten Treg-Messungen wurden für die Patienten und freiwilligen Kontrollspender Einwilligungserklärungen und Aufklärungsbögen erstellt, welche ebenfalls von der lokalen Ethikkommission genehmigt wurden.

Für die Auswertungen wurden Blutbilder aus dem Datenbestand der inneren Klinik verwendet.

Abkürzungen:

PB= peripheres Blut; KM= Knochenmark; CTX= Chemotherapie; HD-CTX= Hochdosis-Chemotherapie

Erklärungen zu den Therapien:

Unter CTX sind Therapien mit den Substanzen Vincristin, Epirubicin und Dexamethason (VED) oder Vincristin, Adriamycin und Dexamethason (VAD) oder niedrig dosiertes Melphalan zu verstehen.

Bei HD-CTX wurde Melphalan hoch dosiert eingesetzt.

Abhängig vom individuellen Krankheitsverlauf kann es zu Modifikationen oder Erweiterungen der Behandlung gekommen sein.

Patienten Nr.	Geschlecht	Alter	Verwendete Proben	Therapie
72	männlich	55	PB, KM	Keine
27	männlich	58	KM	Keine
39	männlich	65	PB, KM	Keine/ CTX
25	weiblich	62	KM	Keine/ CTX
41	weiblich	53	KM	Keine
15	weiblich	67	PB	Keine
17	weiblich	69	PB, KM	Keine
40	weiblich	48	PB, KM	Keine/ CTX/ HD-CTX/ Immuntherapie
22	männlich	54	PB	Keine
30	männlich	65	KM	Keine

3	weiblich	64	PB, KM	Keine
32	männlich	74	PB, KM	CTX
67	männlich	76	PB	CTX
14	weiblich	63	PB, KM	CTX
38	männlich	55	KM	CTX
6	weiblich	59	KM	CTX/ HD-CTX
20	männlich	53	PB/ KM	CTX/ HD-CTX/ Immuntherapie
23	weiblich	71	PB	CTX
13	männlich	54	PB/ KM	CTX
51	männlich	58	PB	CTX
52	männlich	62	PB	CTX
11	männlich	63	PB	HD-CTX
8	männlich	61	PB/ KM	HD-CTX
1	männlich	51	KM	HD-CTX
24	männlich	64	PB	HD-CTX
33	männlich	67	PB/ KM	HD-CTX
35	männlich	46	PB/ KM	HD-CTX
71	weiblich	59	PB	HD-CTX
37	männlich	55	PB/ KM	HD-CTX
55	männlich	49	PB/ KM	HD-CTX
10	männlich	66	PB/ KM	HD-CTX
28	männlich	63	KM	HD-CTX
31	weiblich	41	KM	HD-CTX
21	männlich	47	PB/ KM	HD-CTX
44	weiblich	56	KM	HD-CTX
16	weiblich	68	PB	HD-CTX
45	männlich	55	KM	HD-CTX
12	weiblich	79	PB/ KM	HD-CTX
70	weiblich	59	PB	HD-CTX
29	weiblich	48	PB/ KM	HD-CTX
69	weiblich	69	PB	HD-CTX
7	männlich	53	PB/ KM	HD-CTX
13	männlich	54	KM	HD-CTX

2.1.11 Patientenproben Bronchialkarzinom (BK)

Patienten Nr.	Geschlecht	Alter	Verwendete Proben	Therapie
65	männlich	65	PB	Keine
60	männlich	71	PB	Keine
49	männlich	57	PB	Keine
61	weiblich	66	PB	Keine
64	männlich	43	PB	Keine
50	weiblich	48	PB	Keine
62	männlich	48	PB	Keine
54	männlich	68	PB	Keine
43	männlich	73	PB	Keine
57	weiblich	67	PB	Keine
53	weiblich	55	PB	Keine
58	männlich	62	PB	Keine
59	männlich	52	PB	Keine

2.2 Zellkulturtechniken

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Zellkulturtechniken wurden unter sterilen Bedingungen in einer entsprechenden Werkbank durchgeführt. Alle benutzten Lösungen, Puffer und Verbrauchsmaterialien wurden durch Sterilfiltration oder Autoklavieren sterilisiert oder wurden vom Hersteller steril verpackt geliefert.

2.2.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten primären Zellen wurden in Zellkulturmedium (siehe Material) bei 37°C, feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre und 5%CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden entweder in bestimmten Zeitabständen oder bei erreichter Konfluenz (80-90%) passagiert. Hierzu wurde bei Suspensionszellen je nach Dichte ein Aliquot entnommen und in ein neues Kulturgefäß mit frischem Medium überführt. Bei adhärenenten Zellen wurde zunächst der Überstand abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde eine Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben um die Zellen vom Boden des Kulturgefäßes zu lösen. Nach Ablösung der Zellen wurde

neues Medium hinzugegeben und die Zellen gut resuspendiert. Ein je nach Dichte festgelegtes Aliquot dieser Zellsuspension wurde anschließend in ein neues Kulturgefäß mit frischem Medium überführt.

2.2.2 Kryokultivierung von eukaryotischen Zellen

Die Zellen wurden abzentrifugiert (300g, 5min) und das Medium entfernt. Anschließend wurden die Zellen in Einfriermedium aufgenommen. Ein Aliquot enthielt 1ml Zellsuspension, wobei die Zellzahl 2×10^7 bis 5×10^7 Zellen pro ml betrug. Die Zellen wurden im Einfriermedium gründlich und schnell resuspendiert und sofort aliquotiert. Zum langsamen und schonenden Einfrieren der Zellen wurden die vorbereiteten Aliquots in eine Einfrierbox überführt und zunächst für 2-3 Tage bei -80°C eingefroren. Anschließend wurden die Aliquots in Stickstofftanks überführt.

Zum Auftauen wurde ein Aliquot Zellen aus dem -80°C Schrank oder dem Stickstofftank entfernt und sofort bei 37°C im Wasserbad inkubiert, bis die Suspension nahezu aufgetaut war. Die Suspension wurde sofort 1:10 mit FKS verdünnt und abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet zweimal in Medium gewaschen und die Zellen in Kultur genommen.

2.2.3 Bestimmung von Zellzahlen

Zur Bestimmung der Zellzahlen wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Die zumeist verwendete Methode war die Zählung der Zellen mittels eines Durchflußzytometers. Hierbei wurde der zu zählenden Zellsuspension ein Aliquot von 50-100µl entnommen und in ein Facsröhrchen überführt. Sollten bestimmte Zellpopulationen innerhalb dieser Suspension gezählt werden, wurde die entsprechende Antikörperfärbung wie in 2.2.4 beschrieben durchgeführt. Nach Abschluß der Färbung wurde dasselbe Volumen an Flow-Count-Flourospheres zugegeben. Da es sich bei den Flow-Count-Flourospheres um eine Suspension fluoreszierender Partikel mit einer festgelegten Anzahl pro µl handelt, kann die Messung dieser Partikel mit den Zellen in der zu messenden Zellsuspension in Bezug gesetzt werden. Die Zellzahl ist so direkt am Durchflußzytometer ablesbar.

Eine andere Methode der Zellzählung ist die Verwendung der Neubauer-Zählkammer (Abbildung 2.1). Hierzu wird ein Aliquot der zu bestimmenden Zellsuspension in einer geeigneten Verdünnung auf eine vorbereitete Neubauer-Zählkammer gegeben.

Unter dem Mikroskop können dann Quadranten ausgezählt werden, und unter Berücksichtigung der Verdünnung kann die Zellzahl errechnet werden. Durch Hinzugeben von Trypanblau können bei dieser Methode lebende von toten Zellen unterschieden werden.

Formel zur Berechnung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer:

Mittelwert der Zellzahl in den Quadranten * Verdünnungsfaktor * 10^4 = Zellzahl/ml

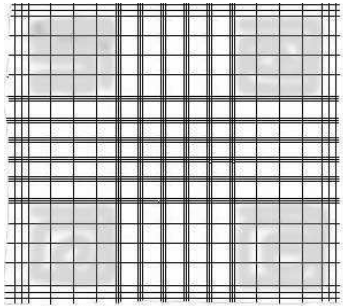


Abbildung 2.1: Neubauer-Zählkammer

Die vier Quadranten, in denen die Zellen ausgezählt werden sind in grau unterlegt. Jeder Quadrant hat hierbei eine Abmessung von 1mm^2 .

2.2.4 Antikörperfärbung von Zellen

Um verschiedene Zellpopulationen am Durchflußzytometer sichtbar zu machen, wurden zelluläre Oberflächenmoleküle mit Hilfe von Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert. Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden hierbei Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), PE-Texas Red (auch bekannt als ECD) oder Peridinin-Chlorophyllprotein (PC5) verwendet. Die verwendeten Antikörper wurden entweder mit der vom Hersteller empfohlenen oder mit einer zuvor getesteten Konzentration eingesetzt. Für die Antikörperfärbung wurden 50-100µl Zellsuspension in PBS entnommen und mit den gewünschten Antikörpern gemischt. Die Inkubation erfolgte für 15-20min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Anschließend wurden die Zellen in PBS gewaschen und das Pellet in 500µl Facspuffer aufgenommen. Die Analyse der Zellsuspension erfolgte am Durchflußzytometer.

2.2.5 Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie ist eine Methode zur Charakterisierung und Identifizierung verschiedener Zellpopulationen. Hierbei wird deren Größe und Granularität sowie verschiedene fluoreszenzmarkierte Oberflächenmoleküle detektiert. Auch die Messung intrazellulärer Proteine ist nach Permeabilisierung der Zellen möglich. Die

Zellen werden durch eine hydrodynamische Fokussierung in einem Flüssigkeitsstrom an einem Argon-Laser vorbei geführt. Hierdurch wird der monochromatische Laserstrahl gebeugt und gestreut. Fluorochrome an oder auf der Zelle werden angeregt, was eine Energieabgabe in Form von Photonen zur Folge hat. Die so entstandenen Photonen werden von einem Photodetektor registriert, wobei ihre Konzentration proportional zur Menge an Antikörpern auf der Zelle ist. Pro Messung wurden 10000-30000 Ereignisse aufgenommen. Als FI1 wurde FITC, als FI2 PE als FI4 ECD und als FI5 PC5 verwendet (Abbildung 2.2).

Eine zusätzliche Möglichkeit bietet das hier verwendete präparative Durchflußzytometer (FACS). Durch Ablenkung des Flüssigkeitsstrahls, in dem sich die Zellen befinden, ist es hier möglich, lebende Zellen anhand ihrer fluoreszenzmarkierten Oberflächenmoleküle in verschiedene Röhrgen zu sortieren.

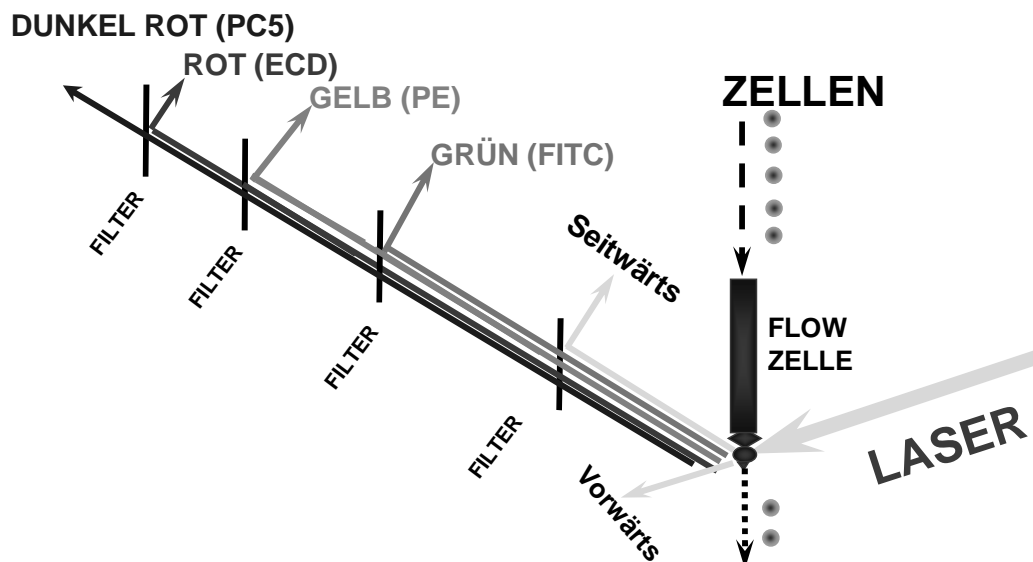


Abbildung 2.2: Funktion eines Durchflußzytometers

Markierte Zellen werden einzeln an einem Laser vorbeigeführt, wodurch der Laserstrahl gebeugt und gestreut wird. Somit ist es möglich Aussagen über die Größe (Vorwärtsdetektor) und Granularität (Seitwärtsdetektor) sowie über das Vorhandensein fluoreszenzmarkierter Oberflächenmoleküle (gekennzeichnet durch die Farbstoffe FITC (Fluoreszein-Isothiocyanat), PE (Phycoerythin), ECD (PE-Texas Red) und PC5(Peridinin-Chlorophyllprotein)) zu treffen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Werner Stellberg).

2.3 Aufarbeitung von Blut- bzw. Knochenmarkproben von MM-Patienten zur Analyse mittels eines Durchflußzytometers

Die Messung verschiedener im Zusammenhang mit Treg relevanter Oberflächenmarker aus Blut- bzw. Knochenmarkproben (Blutbeimengung < 30%) erfolgte mittels eines Durchflußzytometers. Hierzu wurden 100µl der jeweiligen Probe

pro 4-Farben Antikörperprotokoll benötigt. Um die Gerinnung der Probe zu verhindern, wurden EDTA-beschichtete Röhrchen verwendet. Die unverdünnte Probe wurde in 12ml PBS gewaschen und bei 300g für 5min abzentrifugiert. Anschließend erfolgte die Erythrozytenlyse. Nach Zugabe einer 1:10 mit Aqua dest. verdünnten Pharmlyse-Lösung wurden die Zellen resuspendiert und 20min bei RT inkubiert. Nach abgeschlossener Lyse wurden die Zellen abzentrifugiert (300g, 5min) und nochmals mit 12ml PBS gewaschen. Zur Antikörperinkubation wurden die Zellen im ursprünglichen Probenvolumen PBS aufgenommen und auf die verschiedenen Ansätze verteilt. Pro Antikörper wurden 5-10µl eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 15min bei RT und dunkel. Nach erneutem Waschen der Proben mit 2ml PBS wurde 500µl Facspuffer pro Probe zugegeben und die Zellen am Durchflußzytometer analysiert.

2.3.1 Erstellung der Antikörperprotokolle für die Oberflächenmarkeranalysen

Das zur Messung verwendete Durchflußzytometer erlaubte die Messung von vier Farben in einem Ansatz. Die Analytik sollte zunächst die für Treg beschriebenen Oberflächenmarker CD4, CD25, CTLA-4, CD62L, CD45RA, CD45RO und CD27 beinhalten. Um ein möglichst genaues Fenster („Gate“) zu erstellen, das die Treg beinhaltet, wurden zunächst Blutproben von 11 normalen Spendern wie in 2.2.4 beschrieben vorbereitet und am Durchflußzytometer gemessen. Die Treg wurden in einer Messung von CD4 gegen CD25 dargestellt, und die CD4⁺ CD25^{high} positiven Zellen so markiert, dass wie in der Literatur für normale Spender beschrieben wurde, die oberen 2-5% der CD4⁺-Zellfraktion als Treg-Zellen deklariert wurden (Prabhala et al., 2006; Sakaguchi, 2004, Beyer et al., 2006). Die zum Teil optisch sichtbare Abgrenzung einer Treg-Population wurde ebenfalls berücksichtigt. Auch eine Analyse der so gefundenen Population zeigte eine Übereinstimmung mit den in der Literatur beschriebenen Oberflächenmarkercharakteristika. Die so ermittelten und für die Analyse verwendeten Antikörperprotokolle waren:

1. CD4- FITC / CD25-PE / CD3-ECD / CD8-PC5
2. CD4-FITC / CTLA-4-PE / CD62L-ECD / CD25-PC5
3. CD45RA-FITC / CD25-PE / CD45RO-ECD / CD4-PC5
4. CD4-FITC / CD25-PE / CD45RO-ECD / CD27-PC5

Hierbei wurden in jedem Protokoll die Marker CD4 und CD25 verwendet um das oben beschriebene Gate in jedem Protokoll vergleichbar setzen zu können.

2.3.2 Optimierung des Antikörperpanels für die Oberflächenmarkeranalysen

Die in 2.3.1 beschriebenen Antikörperprotokolle wurden später optimiert, da ein neuer in der Literatur beschriebener Oberflächenmarker mit aufgenommen werden sollte, um eine noch genauere Charakterisierung der Treg zu ermöglichen. Der zusätzliche Marker war CD127. Zusätzlich sollte auch der Marker CD85j aufgenommen werden. Des Weiteren sollten die Marker CD4 und CD25 in jedem Protokoll in den gleichen Farben gemessen werden, um auch hier eine bessere Vergleichbarkeit zu erlangen. Übergangsweise wurden 10 Proben sowohl mit dem alten als auch mit dem neuen Protokoll gemessen und so eingestellt, dass die Treg-Gates weitestgehend übereinstimmten und auch die Einstellungen der alten und neuen Protokolle vergleichbar blieben. Die neuen Protokolle waren:

1. CD8-FITC / CD3-PE / CD4-ECD / CD25-PC5
2. CD8-FITC / CD85j-PE / CD4-ECD / CD25-PC5
3. CD62L-FITC / CTLA-4-PE / CD4-ECD / CD25-PC5
4. CD45RO-FITC / CD45RA-PE / CD4-ECD / CD25-PC5
5. CD8-FITC / CD27-PE / CD4-ECD / CD25-PC5
6. CD8-FITC / CD127-PE / CD4-ECD / CD25-PC5

2.3.3 Intrazelluläre Färbung mit Anti-FOXP3-Antikörpern

Da es sich bei FOXP3 um einen Transkriptionsfaktor handelt, ist hier eine intrazelluläre Färbung notwendig. Um dem Antikörper den Zugang zu FOXP3 zu ermöglichen, mussten die Zellmembranen permeabilisiert werden, was wiederum eine Fixierung der Zellen voraussetzt.

Die intrazelluläre Färbung mit Anti-FOXP3-Antikörpern erfolgte mittels des PE anti-human FOXP3 Staining Set der Firma NatuTec. Die zu färbende Zellfraktion (mindestens 1×10^6 Zellen pro Ansatz) wurde zunächst in PBS gewaschen und so verteilt, dass pro Ansatz 100µl Zellsuspension zur Verfügung stand. Anschließend erfolgte die Färbung mit den Oberflächenmarkern CD4-FITC und CD25-PC5. Hierzu wurden 5-10µl der jeweiligen Antikörper zugegeben und die Zellsuspension 15min

bei RT inkubiert. Das Waschen der Zellen erfolgte pro Ansatz mit 2ml Facspuffer. Nach dem Waschen wurde der Überstand weitestgehend abgesaugt und die Zellen in der verbliebenen Flüssigkeit kurz gemischt. Zu den so behandelten Zellen wurde pro Ansatz 1ml Fix/Perm Puffer gegeben und die Zellen ein weiteres Mal kurz gemischt. Anschließend erfolgte eine 30minütige Inkubation bei 4°C im Dunkeln. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen mit je 2ml Facspuffer gewaschen und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden dann zweimal mit je 2ml Permeabilisierungspuffer gewaschen und der Überstand ebenfalls verworfen. Das Blockieren von unspezifischen Bindungsstellen erfolgte pro Ansatz mit 100µl einer 2%igen Lösung von Rattenserum in Permeabilisierungspuffer für 15min bei 4°C im Dunkeln. Anschließend wurde pro Ansatz 20µl FOXP3-Antikörper hinzugegeben und weitere 30min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit je 2ml Permeabilisierungspuffer gewaschen und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 500µl Facspuffer aufgenommen und die Probe am Durchflußzytometer analysiert.

2.4 Isolierung der mononukleären Zellfraktion aus Vollblut

Um Treg aus peripherem Blut oder Buffy-Coat-Präparaten normaler Spender zu isolieren, wurde zunächst die mononukleäre Zellfraktion mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Nach der Zentrifugation treten hierbei drei Phasen auf. Im Pellet befinden sich Erythrozyten und Granulozyten, deren Dichte höher ist, als die des Ficoll-Trennmediums. In der Interphase, die direkt auf dem Ficoll-Trennmedium aufliegt befindet sich die mononukleäre Zellfraktion bestehend aus Lymphozyten und Monozyten. Der Überstand enthält das Blutplasma.

2.4.1 Aufreinigung mononukleärer Zellen mittels Dichtegradient-Zentrifugation („lange“ Methode)

Da sich in der mononukleären Zellfraktion oft noch eine bei einer weiteren Aufreinigung möglicherweise störende Anzahl an Thrombozyten befindet, wurde bei diesem Protokoll besonders auf die Reinheit der mononukleären Zellfraktion geachtet. Zunächst wurde das periphere Blut bzw. das Buffy-Coat-Präparat 1:3 mit PBS und 10U/ml Heparin zur Verhinderung der Blutgerinnung verdünnt. In einem 50ml-Röhrchen wurden 30ml des verdünnten Blutes vorsichtig auf 15ml Ficoll

aufgeschichtet und anschließend bei 160g 20min ohne Bremse zentrifugiert. Nach dieser langsamen Zentrifugation befindet sich noch ein großer Teil der Thrombozyten, die ansonsten in die Interphase absinken könnten im Überstand. 20ml des Überstandes wurden daher vorsichtig abgesaugt. Anschließend erfolgte eine zweite Zentrifugation bei 300g für 20min ohne Bremse, um die Auftrennung nach der Dichte abzuschließen. Nach der Zentrifugation wurde ein Großteil des Überstandes abgesaugt und anschließend die mononukleäre Zellfraktion abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Dies geschah sehr vorsichtig mit Hilfe einer 1000µl Pipette, um möglichst wenig Ficoll-Trennmedium zusammen mit der mononukleären Zellfraktion abzunehmen. Die mononukleären Zellen wurden 3mal in PBS mit 10U/ml Heparin gewaschen (Zentrifugation: 350g 5min) und anschließend in RPMI-Medium bei 4°C über Nacht gelagert.

2.4.2 Aufreinigung mononukleärer Zellen mittels Dichtegradient-Zentrifugation („kurze“ Methode)

Diese Methode ergab eine bessere Ausbeute als die unter 2.4.1 beschriebene, da der erste Zentrifugationsschritt und das anschließende Absaugen des Überstandes, in dem sich auch noch mononukleäre Zellen befanden, entfällt. Wie unter 2.4.1 beschrieben wurde das Blut verdünnt und aufgeschichtet. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 300g für 30min ohne Bremse. Die mononukleäre Zellfraktion wurde in ein neues Gefäß überführt, wie unter 2.4.1 beschrieben gewaschen und anschließend ebenfalls bei 4°C über Nacht gelagert.

2.5 Isolierung von Treg aus peripherem Blut bzw. Buffy Coat-Präparaten von normalen Spendern

Für die Etablierung der Aufreinigung von Treg wurden Blutproben von normalen Spendern oder Buffy-Coat-Präparate verwendet. Es wurden zwei verschiedene Aufbereitungsformen von Buffy Coats verwendet, gefilterte und nicht gefilterte. Verglichen wurden Isolierungsmethoden mittels magnetischer Beads, bei denen der Nachteil besteht, dass die CD25-markierenden Beads im Anschluß an die Aufreinigung entfernt werden müssen oder aber für den weiteren Versuch an der Zelle haften bleiben. Zusätzlich wurden in einer der Methoden verschiedene Säulen

eingesetzt und deren Einfluß auf das Aufreinigungsergebnis getestet. Als alternative Möglichkeit wurde die präparative Durchflußzytometrie mit und ohne vorherige Aufreinigung der CD4⁺-Zellfraktion durchgeführt. Vor jeder Aufreinigung wurde ein Aliquot der mononukleären Zellfraktion entnommen und mit dem Protokoll: CD4-FITC / CD25-PE / CD3-ECD / CD8-PC5 analysiert, um so die Anzahl der Treg in der Probe zu messen. Nach erfolgreicher Aufreinigung wurde die Anzahl der isolierten Treg ebenfalls anhand eines Durchflußzytometers bestimmt und die Ausbeute für die durchgeführte Isolierung berechnet.

2.5.1 Isolierung von Treg über magnetische Beads und Säulen (System Miltenyi)

Für die Isolierung über magnetische Beads unter Verwendung von Säulen wurde das CD4+CD25+Regulatory T Cell Isolation Kit (human) der Firma MACS Miltenyi verwendet. Als Ausgangszellzahl wurden zwischen 2×10^7 und 9×10^7 mononukleäre Zellen verwendet. Zunächst erfolgte die Markierung der CD4-negativen Zellen. Hierzu wurden die Zellen abzentrifugiert, in 90µl Puffer je 10^7 Zellen aufgenommen und gut resuspendiert. Anschließend wurden 10µl je 10^7 Zellen des Biotin-Antikörper-Cocktails hinzugegeben. Dieser Cocktail enthielt Biotin-konjugierte Antikörper gegen CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCRγ/δ und Glycophorin A. Somit wurden alle Zellen markiert, bei denen es sich nicht um CD4-positive Lymphozyten handelte. Die Inkubation erfolgte 10min bei 4°C. Da nach wurden 20µl je 10^7 Zellen Anti-Biotin Micro Beads zugegeben und gut durchmischt. Die Inkubation erfolgte für 15min bei 4°C. In diesem Schritt banden die magnetischen Beads an die oben genannten Antikörper, so dass die nicht CD4-positiven Lymphozyten an magnetische Beads gekoppelt waren. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und bis zu 10^8 Zellen in 500µl Puffer resuspendiert. Nun wurden die CD4-negativen Zellen über eine Säule abgetrennt. Verwendet wurde die vom Hersteller empfohlene LD-Säule, bei der es sich um eine sehr dicht gepackte und weit ausgefüllte Säule handelte, oder die für andere Aufreinigungen vorgesehene LS-Säule, die weniger dicht gepackt und weniger weit aufgefüllt war, da hier eine wesentlich bessere Ausbeute erreicht werden konnte. Die Säule wurde im Magnetfeld platziert und mit 2ml Puffer equilibriert. Anschließend wurde die vorbereitete Zellsuspension auf die Säule gegeben und die durchlaufenden Zellen gesammelt. Die Säule wurde anschließend gewaschen. Die Zellsuspensionen wurden am Durchflußzytometer analysiert. Hierbei

wurde die folgende Antikörperkombination verwendet: CD4-FITC / CD25-PE / CD3-ECD / CD8-PC5. Der CD25-Antikörper wurde so gewählt, dass er ein anderes Epitop als die CD25-Microbeads erkannte. Im nächsten Schritt erfolgte die Markierung der CD4-positiven CD25^{high}-positiven Zellen. Hierzu wurde die gesammelte Zellsuspension abzentrifugiert und in 90µl Puffer je 10^7 Zellen aufgenommen. Es folgte die Zugabe von 10µl CD25 Micro Beads je 10^7 Zellen. Nach gutem Resuspendieren wurden die Zellen für 15min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und bis zu 10^8 Zellen in 500µl Puffer aufgenommen. Die so markierte Zellsuspension wurde auf eine zuvor equilibrierte Säule gegeben. Als Säule wurde entweder die vom Hersteller empfohlene MS Säule verwendet oder die oben beschriebene LS Säule. Der Durchlauf der Säule wurde gesammelt und die Säule 3x mit 500µl Puffer gewaschen. Die CD25^{high}-positiven Zellen waren nun über die Beads an das Säulenmaterial gebunden. Es wurde 1ml Puffer auf die Säule gegeben und die positiven Zellen mit Hilfe eines Kolbens aus der Säule gedrückt. Die erhaltenen Zellsuspensionen wurden wie oben beschrieben am Durchflußzytometer analysiert.

2.5.2 Isolierung von Treg über magnetischer Beads ohne Verwendung von Säulen (System Dynal)

Diese Methode der Isolierung von Treg basiert ebenfalls auf der Verwendung magnetischer Beads. Für die Entfernung der negativen Zellen werden hierbei allerdings keine Säulen verwendet. Die Aufreinigung ist also schonender für die zu isolierenden Zellen. Verwendet wurde das Dynal CD4+CD25+ Treg Kit.

Als Ausgangsmaterial wurden 3×10^7 bis 1×10^8 mononukleäre Zellen verwendet. Zunächst erfolgte die negative Isolation der CD4 positiven Zellen. Hierzu wurden mononukleäre Zellen mit einer Dichte von bis zu 1×10^8 Zellen pro ml in Puffer aufgenommen. Zu je 1×10^8 Zellen wurden 200µl FKS, 100µl CD4 Antikörper Mix und 100µl CD45RA monoklonaler Antikörper zugegeben. Der CD4 Antikörper Mix bestand hierbei aus anti-CD14-, CD56-, CD19-, CD8- und CD235a- (Glycophorin A) Antikörpern, durch die alle Zellen erfasst werden sollten, die nicht zu den CD4-positiven Lymphozyten zählen. Durch die Zugabe des CD45RA-Antikörpers wurden zusätzlich naive Zellen markiert. Die Inkubation erfolgte für 10min bei 4°C. Die Zellen wurden in Waschpuffer gewaschen und in 9ml Waschpuffer aufgenommen. Nun erfolgte die Zugabe von 1ml in Waschpuffer gewaschener Depletion-Dynabeads.

Diese Beads sind mit Fc spezifischen humanen IgG4 Antikörpern beschichtet, so dass alle oben genannten Antikörper erkannt werden. Es wurde 15min bei RT inkubiert und zwischendurch vorsichtig resuspendiert. Anschließend wurden weitere 10ml Puffer zugegeben und das Röhrchen in einem Magnetfeld platziert. Die Inkubation im Magnetfeld betrug ca. 2min. Der Überstand mit der CD4 positiven Fraktion wurde vorsichtig abgenommen, die Beads nochmals gewaschen und die restlichen nicht an die Beads gebundenen Zellen abgenommen. Danach erfolgte eine durchflußzytometrische Analyse der CD4-positiven Fraktion. Die negative Fraktion konnte hier nicht analysiert werden, da die Kopplung an die Beads in diesem Schritt irreversibel war. Nun erfolgte die positive Isolation der CD25-positiven Zellen. Die CD4-positive Fraktion wurde zu $1,5 \times 10^7$ Zellen/ ml in Waschpuffer aufgenommen und die Zellsuspension zu gewaschenen, vom Überstand befreiten CD25-Dynabeads gegeben (200µl je $1,5 \times 10^7$ Zellen). Die Inkubation erfolgte für 25min bei 4°C unter leichtem Schütteln. Anschließend wurde das Röhrchen in einem Magnetfeld platziert und dort ca. 2min inkubiert. Der Überstand (CD4⁺CD25⁻-Zellen) wurde vorsichtig entfernt. Das Röhrchen wurde nun aus dem Magnetfeld entfernt und ca. 2ml Puffer zugegeben. Es wurde vorsichtig resuspendiert und der Überstand nochmals abgenommen. Die CD4⁺CD25^{high}-Fraktion blieb bei diesen Schritten weiterhin an die magnetischen Beads gekoppelt. Im nächsten Schritt wurden die Beads entfernt. Hierzu wurde zunächst ein Röhrchen mit FKS beschichtet. Anschließend wurden die an Beads gebundenen CD4⁺CD25^{high}-Zellen in Medium resuspendiert (2×10^7 Zellen je 100µl Medium). Zu je 50µl zugegebenen CD25-Beads wurden 20µl Detachabead gegeben und unter leichtem Schütteln ca. 50min bei RT inkubiert. Bei Detachabead handelt es sich um Schaf- anti Maus-Fab in PBS gelöst. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Röhrchen erneut in einem Magnetfeld platziert und der Überstand, der die CD4⁺CD25^{high}-Zellen enthielt in ein neues Röhrchen überführt. Die verbliebenen Dynabeads, wurden noch zweimal in Medium gewaschen und die jeweiligen Überstände vereinigt. Die so erhaltenen CD4⁺CD25^{high}-Zellen wurden zweimal in Medium gewaschen und anschließend in Kultur genommen.

2.5.3 Isolierung von Treg mittels magnetischer Beads und eines präparativen Durchflußzytometers (FACS)

Für diese Methode wurden 2×10^7 bis 6×10^7 mononukleäre Zellen als Ausgangsmaterial verwendet. Zunächst wurden die CD4-positiven Zellen wie in 2.5.1 beschrieben isoliert. Die aufgereinigte Zellfraktion wurde in 100µl PBS mit 10U/ml Heparin je 1×10^6 Zellen aufgenommen. Zu 100µl Zellsuspension wurden anschließend 4µl Antikörper gegeben. Verwendet wurden die Antikörper CD4-FITC und CD25-PE. Die Inkubation betrug 20min bei RT. Während der Inkubation wurden die Zellen mehrmals vorsichtig resuspendiert, um ein Absinken der Zellen und eine damit verbundene schlechtere Bindungsmöglichkeit für die Antikörper zu verhindern. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS mit 10U/ml Heparin gewaschen und das Pellet in 1ml PBS mit 10U/ml Heparin aufgenommen. Die so vorbereitete Zellsuspension wurde mittels eines präparativen Durchflußzytometers (FACS Vantage, Laser Coherent, 0.4W; Benutzung mit freundlicher Unterstützung von Herrn Klaus Lennartz) in CD4-positive CD25-negative und CD4-positive CD25-hoch positive Zellen (Treg) aufgetrennt. Die restlichen Populationen wurden verworfen. Das FACS wurde hierbei so eingestellt, dass die zuvor mittels des Protokolls: CD4-FITC / CD25-PE / CD3-ECD / CD8-PC5 gemessene Treg Prozentzahl der jeweiligen Probe (siehe 2.3.1) und die eventuell optisch sichtbar abgegrenzte Population von Treg nicht überschritten wurden. Die erhaltenen Zellpopulationen wurden bei ausreichender Zellzahl am Durchflußzytometer auf ihre Reinheit hin überprüft. Eine erneute Färbung der einzelnen Zellpopulationen war hierzu nicht erforderlich, da eine Färbung mit CD4-FITC und CD25-PE vor der Sortierung bereits erfolgt war. Die so erhaltenen Treg wurden anschließend in Kultur genommen oder direkt für Suppressionstests verwendet.

2.5.4 Isolierung von Treg über ein FACS

Diese Methode beinhaltet die ausschließliche Isolierung von Treg über ein FACS. Die mononukleäre Zellfraktion (2×10^7 bis $3,5 \times 10^8$ Zellen als Ausgangsmaterial) wurde hierbei über eine Dichtegradientenzentrifugation wie in 2.4.1 bzw. 2.4.2 beschrieben isoliert. Anschließend wurde ein Aliquot entnommen und in dem Protokoll: CD4-FITC / CD25-PE / CD3-ECD / CD8-PC5 gemessen. Die so erhaltene Treg-Prozentzahl wurde unter anderem als Grundlage für die spätere Sortierungseinstellung

verwendet. Die Zellen wurden nun wie unter 2.5.3 beschrieben gefärbt und in CD4 positive CD25 negative und CD4-positive CD25-hoch positive Zellfraktionen unterteilt. Um eine Apoptose der Zellen während der Färbeprozesse oder während der Sortierung zu verhindern, wurde teilweise 10% FKS zu der PBS/Heparinmischung gegeben. Ebenso wurden die für die Sortierung verwendeten Röhrchen vor Benutzung für 1h bei 4°C mit 100% FKS beschichtet, um ein Anheften der Zellen an die Röhrchenwand zu verhindern. Die für das FACS verwendeten Auffangröhrchen enthielten zusätzlich 200µl bis 1ml 100% FKS. Bei ausreichender Zellzahl wurde auch hier im Anschluß an die Sortierung eine durchflußzytometrische Analyse zur Bestimmung der Reinheit der Fraktionen durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen in Kultur genommen oder direkt für Suppressionstests verwendet.

2.6 Expansion isolierter Treg

2.6.1 Expansion mit Hilfe von beschichteten Platten und löslichen

Antikörpern

Da Treg eine eher kleine Population von nur 2-5% der CD4-positiven Zellen darstellen, sollte eine Möglichkeit etabliert werden, die isolierten Zellen für weitere Analysen zu expandieren. Hierzu wurden zunächst CD3- und CD28-spezifische Antikörper in Kombination mit IL-2 verwendet. Eingesetzt wurden 50-300U/ml IL-2 und 0,5-5µg/ml anti-CD3 bzw. anti-CD28 Antikörper. Der CD3-spezifische Antikörper wurde mit PBS auf die genannten Konzentrationen verdünnt und auf eine Platte mit 96 Vertiefungen („wells“) aufgetragen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Als Kontrolle dienten nur mit PBS beschichtete Platten. Anschließend wurde die Platte 3mal mit je 200µl PBS pro Vertiefung gewaschen und die Zellsuspensionen (Treg bzw. CD4-positive CD25-negative Zellen) auf die Platte aufgebracht. Die Zellen wurden in je 200µl Medium ausgesät, das sowohl den löslichen anti-CD28-Antikörper als auch IL-2 enthielt. Treg wurden in Konzentrationen von 1×10^4 bis 3×10^5 Zellen pro Vertiefung und pro 200µl Medium ausgesät. Die als Kontrolle dienenden CD4-positiven CD25-negativen Zellen wurden mit 3×10^4 bis 2×10^5 Zellen pro Vertiefung und pro 200µl Medium ausgesät. Die Inkubation erfolgte für 7-36 Tage bei 37°C und 5% CO₂.

2.6.2 Expansion mit Hilfe von beschichteten Beads (Dynabeads Human Treg Expander)

Bei dieser Methode wurde die Expansion der Treg mit Hilfe des Dynabeads Human Treg Expander Kits durchgeführt. Bei diesem Kit handelt es sich um eine Suspension von mit CD3- und CD28-spezifischen Antikörpern beschichteten Beads in PBS mit 0,1% humanem Serumalbumin. Die Beads haben eine Größe von $4,5\mu\text{m}$ und sind magnetisch. Sie liegen als Suspension mit 2×10^7 Beads/ml vor. Vor Gebrauch wurden die Beads zunächst in PBS mit 0,1% BSA gewaschen. Hierzu wurde die gewünschte Menge Beads in ein Eppendorf-Gefäß oder Einfrierröhrchen überführt und der Waschpuffer zugegeben. Nach Resuspension wurden die Beads mit Hilfe eines Magneten vom Überstand getrennt und anschließend im ursprünglichen Volumen Puffer wieder aufgenommen. Am Tag der Isolierung wurden 1×10^5 Zellen in 100µl Medium in einer 96-well Platte platziert. Zu den Zellen wurden 20µl der gewaschenen Beads und 500U/ml IL-2 gegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 37°C und 5% CO₂. An Tag 1 wurden nochmals 100µl Medium mit 500U/ml IL-2 zugegeben. An Tag 3 wurden die Zellen resuspendiert und 1:2 gesplittet. Zu jeder Vertiefung wurden anschließend 100µl frisches Medium mit 500U/ml IL-2 gegeben. An Tag 5-7 wurden die Zellen je nach Wachstum gesplittet und in eine Platte mit 24 Vertiefungen überführt. Das Medium enthielt weiterhin 500U/ml IL-2. An Tag 8 wurden die Beads entfernt. Hierzu wurden die Zellen in ein 15ml-Röhrchen überführt und gut resuspendiert. Das Röhrchen wurde anschließend in einem Magnetfeld platziert und leicht geschwenkt. Nach ca. 2min wurde der Überstand, in dem sich die expandierten Zellen befanden abgenommen und die Beads verworfen. Das Pellet wurde in frischem Medium mit 100U/ml IL-2 aufgenommen und wieder in Kultur genommen. Nach 3-14 Tagen wurden die Zellen abzentrifugiert und das Pellet in Medium ohne IL-2 aufgenommen. Nach einer weiteren Inkubation von 3-7 Tagen wurden die Zellen in den Suppressionstest eingesetzt.

2.7 Suppressionstest mit isolierten Treg

2.7.1 Test verschiedener Stimulierungssysteme

Um ein System zu etablieren, in dem es möglich ist CD4-positive CD25-negative Zellen zu stimulieren, um bei Zugabe von Treg eine Suppression messen zu können

wurden die Reaktion von mononukleären Zellen auf verschiedene Stimuli getestet. Hierbei wurden zu 1×10^5 bzw. zu 5×10^4 mononukleären Zellen verschiedene Stimuli gegeben. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Stimulus. Zu jedem Ansatz wurden pro 1×10^5 bzw. 5×10^4 Zellen folgende Mengen CD3-, CD28-spezifische Antikörper sowie IL-2 gegeben, alle Ansätze wurden in Triplika pipettiert:

Ansatz	Stimuli
1	Keine Zugaben
2	2µg/ml CD3 und CD28
3	5µg/ml CD3 und CD28
4	2µg/ml CD3 und CD28; 100U/ml IL-2
5	5µg/ml CD3 und CD28; 100U/ml IL-2
6	10µg/ml CD3; 1µg/ml CD28
7	5µg/ml CD3

Die Proliferation der mononukleären Zellen im Test wurde mittels Tritium-Thymidin-Einbau gemessen (freundlicherweise durchgeführt im Institut für Immunologie unter Leitung von Frau PD Dr. M. Lindemann). Für den Tritium-Thymidin-Einbau wurden 10µl H³-Thymidin-Lösung (=1µCi (1Ci= $3,7 \cdot 10^{10}$ Bq), spez. Aktivität 5 Ci/mmol, TRA 120, Amersham Buchler) pro Vertiefung über den Hamilton-Dispensor und eine 1ml Tuberkulinspritze zugegeben. Die verwendete H³-Thymidin-Lösung setzt sich hierbei folgendermaßen zusammen: 9ml RPMI 1640-Medium und 1ml TRA 120. Der Einbau erfolgte für 18h, und die anschließende Auswertung wurde mit Hilfe eines Harvester 96 Erntegerätes der Firma Tomtec sowie eines 1450 Microbeta Trilux® Messgerätes der Firma Wallac durchgeführt. Die Messwerte wurden in „counts per minute (cpm)“ erfaßt.

2.7.2 Testaufbau A

Für diesen Test wurden isolierte und expandierte Treg verwendet. Pro Vertiefung einer Mikrotiterplatte wurden in 200µl Medium folgende Verhältnisse von Treg zu CD4-positiven CD25-negativen Zellen ausgesät: 1:1; 0,5:1; 1:0,5. Als Kontrolle wurden CD4-positive CD25-negative Zellen gegen CD4-positive CD25-negative Zellen in den Verhältnissen: 1:1 und 0,5:1 ausgesät. Alle Ansätze wurden als Triplika

pipettiert. Zu jeder Vertiefung wurden 2µg/ml CD3- und CD28-spezifische Antikörper gegeben. Die Auswertung erfolgte mittels Tritium-Thymidin-Einbau (siehe 2.7.1) als Proliferationsmarker von Tag 4 auf Tag 5.

2.7.3 Testaufbau B

Der Testaufbau A wurde nachträglich verändert, um deutlichere Ergebnisse erzielen zu können. Die hier verwendeten Zellen wurden nach der Isolierung nicht expandiert. Treg gegen CD4-positive CD25-negative Zellen wurde nun in den Verhältnissen 1:1 und 0,5:1 gemessen; als Kontrolle wurden CD4-positive CD25-negative Zellen im Verhältnis 1:0 und 2:0 ausgesät. In den Ansätzen, in denen ausreichend Treg vorhanden waren, wurde zusätzlich eine Kontrolle von Treg 1:0 ausgesät. Zu allen Ansätzen wurden 5µg/ml CD3- und CD28-spezifische Antikörper gegeben. Alle Ansätze erfolgten als Triplika. Die Auswertung wurde wie in 2.7.1 beschrieben durchgeführt.

2.8 Statistische Analysen

Wenn nicht anders beschrieben, wurden die statistischen Analysen mit Hilfe des Programmes SPSS für Windows Version 14.0.1 (7. Dec 2005) erstellt. Da bei in dieser Arbeit erhobenen Daten davon ausgegangen wurde, dass sie nicht der Normalverteilung folgen, wurden bei Werten mit $n > 2$ Mediane und 95% Konfidenzintervalle angegeben. Die Ergebnisse der Treg-Messungen bei normalen Spendern und Patienten wurden in Form von Boxplots graphisch dargestellt. Die Bedeutung eines Boxplots ist in Abbildung 2.3 erklärt. Für die Signifikanzberechnungen wurde wenn nicht anders beschrieben, der Mann-Whitney-U-Test verwendet wobei $p\text{-Werte} \leq 0,05$ als statistisch signifikant angesehen wurden.

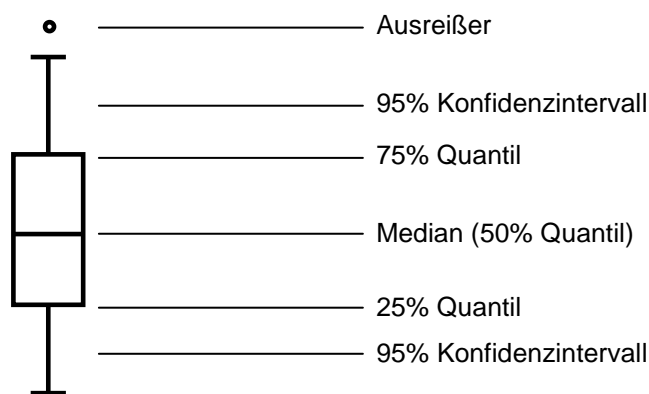


Abbildung 2.3: Erklärung eines Boxplot-Diagramms

Angegeben wird der Median sowie die 95% Konfidenzintervalle. Die untere Abgrenzung der Box stellt das 25% Quantil dar, die obere Abgrenzung das 75% Quantil. Demnach beinhaltet die Box die mittleren 50% aller Werte. Durch die Konfidenzintervalle werden 95% aller Werte angezeigt. Die Markierungen oberhalb der Konfidenzintervalle zeigen Ausreißer an.

3. Ergebnisse

Für die Erhebung der Daten wurden Blut- und Knochenmarkproben von 43 MM-Patienten analysiert. Darüber hinaus wurden auch Blutproben von 13 BK-Patienten abgenommen und untersucht, um die bereits in der Literatur beschriebenen Ergebnisse für Patienten mit soliden Tumorerkrankungen zu reproduzieren und so die eigenen Protokolle zur Treg-Messung zu überprüfen.

Da in zukünftigen Versuchen die Treg-Fraktion der an MM erkrankten Patienten weitergehend getestet werden sollte, war auch die Etablierung geeigneter Methoden zur Isolierung, Expansion und funktionellen Analyse dieser Zellen (zunächst bei normalen Spendern) ein Ziel dieser Arbeit.

3.1 Etablierung eines Durchflußzytometerprotokolls zur Messung von Treg normaler Spender im Vergleich zu MM-Patienten

Ein grundlegendes Problem beim durchflußzytometrischen Nachweis der Treg lag in der Tatsache begründet, dass die Blut- und Knochenmarkproben der MM-Patienten nur geringe Volmina (1-3 ml) besaßen, und man daher mit sehr niedrigen Zellzahlen arbeiten mußte. Aus diesem Grund sollten zunächst durchflußzytometrische Protokolle erstellt werden mit deren Hilfe es möglich war Treg aus Vollblut bzw. Knochenmark ohne vorherige Aufreinigung mittels einer Dichtegradient-Zentrifugation zu messen. Ein Vorteil dieser Methode war die Verhinderung von, möglicherweise durch Ficoll verursachten Artefakten, wie beispielsweise eine Verschiebung der Zellpopulationen durch einen selektiven Verlust einer bestimmten Zellfraktion. Da es sich bei Treg ohnehin um eine sehr kleine Population handelt, könnte ein solches Artefakt negative Auswirkungen auf die Ergebnisse haben.

In der Literatur wurden bereits durchflußzytometrische Messungen mit den Oberflächenmarker CD4 und CD25 durchgeführt. Dabei wurden für normale Spender 2-5% der CD4-positiven Zellen, nämlich die CD4⁺CD25^{high}-Zellen, als Treg erkannt. Diese Fraktion wurde bereits Suppressionstests unterzogen, auf FOXP3-Positivität getestet und als Treg identifiziert (Baecher-Allen et al., 2005; Prabhala et al., 2006; Sakaguchi, 2004, Beyer et al., 2006).

Diese Literaturangaben und eine, wenn vorhanden, optische Abgrenzung einer Population waren Grundlage für die Auswahl der Fenster („Gates“) zur Identifizierung

von Treg bei normalen Spendern. Die so eingestellten Gates wurden bei späteren Messungen von Patientenproben beibehalten, um die Treg-Zahlen von MM-Patienten und von normalen Spendern zu bestimmen. Abbildung 3.1 zeigt die festgelegten Treg-Gates der Analyse der Probe eines normalen Spenders und eines MM-Patienten.

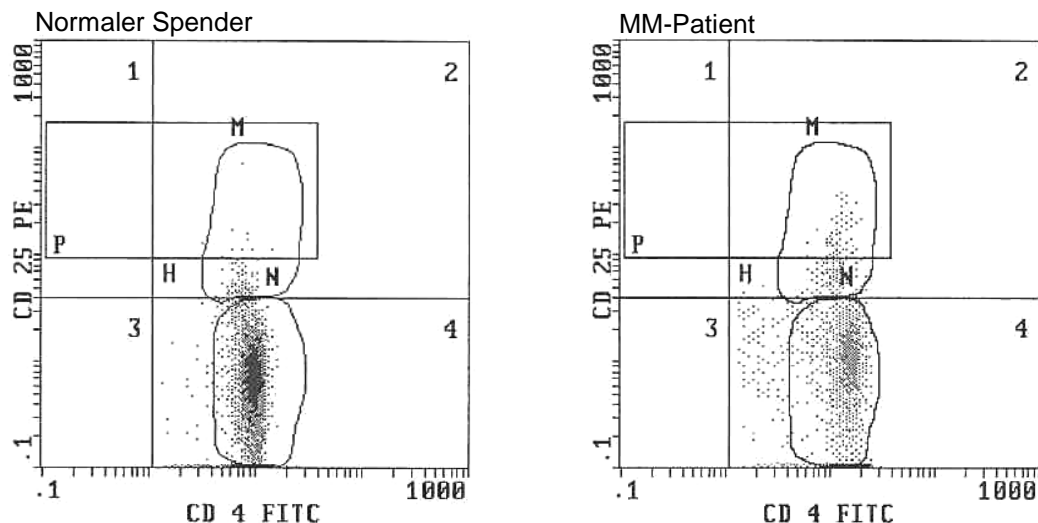


Abbildung 3.1: Fenster („Gates“) für die Messung der Treg.

Gezeigt ist eine CD4- gegen CD25-Messung, wobei die Signale, die als $CD25^{high}$ bezeichnet werden können als Treg-Signale festgelegt wurden (Gate M). Es handelt sich hierbei um die oberen 2-5% der doppelt positiven Signale bei normalen Spendern. In Gate N befinden sich die Signale, die $CD4^{+} CD25^{low}$ - bzw. medium -Zellen repräsentieren. Die in Quadrant 4 gezeigten Signale unterhalb von Gate N stellen $CD4^{+} CD25^{-}$ -Zellen dar.

Die in Gate M gezeigten Signale repräsentieren die Zellen, die im Folgenden als Treg bezeichnet werden. Die Blutprobe des hier gezeigten MM-Patienten zeigt eine höhere Anzahl Treg in Gate M als die des normalen Spenders. Die in Gate M gemessenen Treg wurden bei jeder Analyse zusätzlich zu CD4 und CD25 auch auf andere Treg-typische Oberflächenmarker überprüft. Im späteren Verlauf der Arbeit wurde der Marker CD85j mit in das Protokoll aufgenommen. Tabelle 1 zeigt die Prozentsätze der in Gate M gemessenen Treg, die positiv für den jeweiligen Marker waren. Alle gemessenen Treg waren, wie in Abb. 3.1 gezeigt, zu 100% CD4- und CD25-positiv.

Tabelle 3.1: Charakterisierung der in Gate M gemessenen Treg bezüglich ihrer Oberflächenmarker.

Die in Gate M gemessenen Treg waren zu 70,8%-98,4% positiv für in der Literatur beschriebene Treg-spezifische Oberflächenmarker.

Treg spezifischer Oberflächenmarker	Funktion	Referenz	% positive Treg in Gate M (Median aller gemessenen Proben; Bereich)
CD62L ⁺	Homingrezeptor	Ermann et al., 2005	75 (7,18-95,9)
CTLA-4 ⁺	Antigen; negative Regulierung von Proliferation	Takahashi et al., 2000	70,8 (34,2-95,5)
CD45RO ⁺	Marker für Memory-T-Zellen	Seddiki et al., 2006	94,1 (40,3-100)
CD45RA ⁺	Marker für naive T-Zellen	Seddiki et al., 2006	9,5 (0-92)
CD27 ⁺	Transmembranprotein, gehört zur TNFR Familie	Koenen et al., 2005	74,6 (45-100)
CD127 ^{low}	Alpha-Kette des IL-7 Rezeptors	Hartigan-O'Connor et al., 2006	98,4 (66,7-100)

Weitere Oberflächenmarker	Funktion	Quelle	% positive Treg in Gate M (Median aller gemessenen Proben)
CD 85j ⁺	immunoregulatorisches Protein	Young et al., 2008	97,4 (86-100)

Zu einem sehr hohen Prozentsatz von im Median 98,4% waren die im Treg-Gate gemessenen Zellen schwach positiv für den Marker CD127 (CD127^{low}-Phänotyp). Hierbei handelt es sich um die alpha-Kette des IL-7-Rezeptors, der die durch IL-7 angeregte Proliferation von Lymphozyten steuert. Wie in der Literatur beschrieben, waren auch die in dieser Arbeit als Treg bezeichneten Zellen nur CD127^{low}-positiv (Hartigan-O'Connor et al., 2006; Abb. 2 F). Zu einem Prozentsatz von im Median 75% waren die hier gemessenen Treg-Zellen positiv für CD62L. Dabei handelt es sich um einen Homingrezeptor, mit dessen Hilfe T-Zellen an Endothelzellen binden können, um in Lymphknoten einzuwandern. CTLA-4, ein Antigen, das eine negativ-regulierende Wirkung auf die durch CD28 stimulierte Proliferation von Lymphozyten hat, konnte im Median zu 70,8% auf den im Treg Gate gemessenen Zellen nachgewiesen werden. Auch das Transmembranprotein CD27, das hauptsächlich auf naiven T-Zellen zu finden ist, konnte im Median zu 74,6% nachgewiesen werden. Auffällig war, dass im Median nur 9,5% der Treg positiv für den Oberflächenmarker CD45RA waren und somit einen naiven Phänotyp aufwiesen. Im Gegensatz dazu

waren nahezu alle gemessenen Treg (im Median 94,1%) positiv für den Marker CD45RO. Die hier analysierten Treg zeigten also zu 94,1% einen Phänotyp, der in der Literatur beschriebenen Memory-Treg-Zellen entspricht. (Seddiki et al., 2006).

Der in dieser Arbeit zusätzlich zu den Treg spezifischen Markern gemessene Oberflächenmarker CD85j, bei dem es sich um ein immunoregulatorisches Protein handelt, das auf Subpopulationen von T-Zellen und vielen DZ nachgewiesen werden konnte, wurde im Median zu 97,4% auf den im Treg Gate befindlichen Zellen gefunden. Als Ligand von CD85j, auch LILRB1, ILT2 oder LIR1 genannt, sind bislang nur HLA-Klasse-I-Moleküle (unter anderem HLA-G) bekannt. Deren kontinuierliche Bindung an CD85j führt bei DZ zu einer erhöhten Expression von CD80 und hat eine starke Abnahme der stimulierenden Aktivität auf primäre und Memory-T-Zellen zur Folge. Young et al. (2008) konnten zeigen, dass das Oberflächenprotein CD80 wiederum mit dem auf Treg vorhandenen CTLA-4 interagiert. Das Blockieren von CD80 oder CTLA-4 führte zu einer gesteigerten Proliferation von T-Zellen, wie auch das Depletieren von $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ - Zellen (Treg). Demnach scheinen Treg für die Suppression der T-Zellen verantwortlich zu sein. (Young et al., 2008). Die Bedeutung einer möglichen CD85j-Expression auf Treg ist bislang noch nicht bekannt. Abbildung 3.2 zeigt exemplarische „Dot-Plot“-Diagramme für die in Gate M gemessenen Oberflächenmarker.

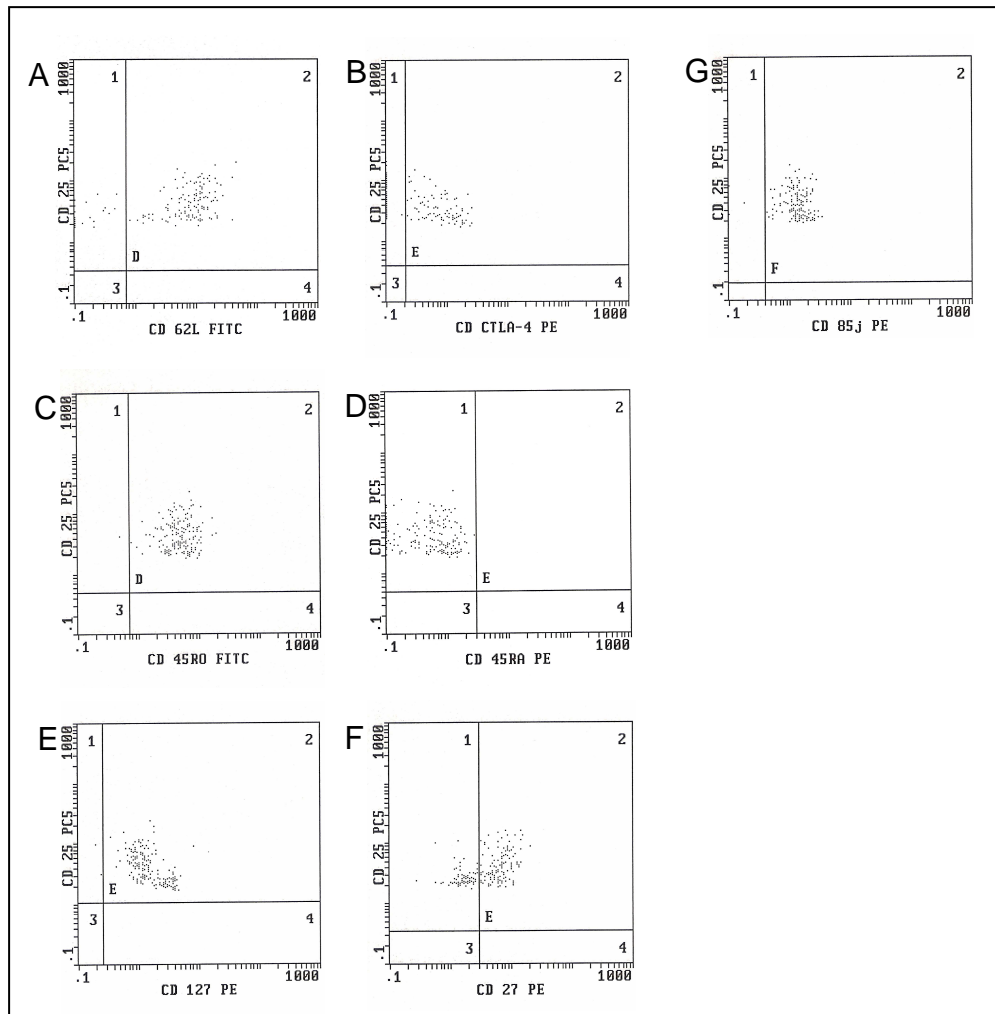


Abbildung 3.2: Messungen Treg spezifischer Oberflächenmarker

Alle verwendeten Gates wurden anhand der Ergebnisse der jeweiligen Isotypkontrollen eingestellt.

A: Messung der CD62L-positiven Treg. Zu sehen ist eine deutliche Trennung der CD62L-positiven und -negativen Zellen. B: Messung der CTLA-4-positiven Treg. Ein ca. 70%iger Anteil der Treg-Zellen war schwach positiv. C: Messung der CD45RO-positiven Treg. Nahezu alle gemessenen $CD4^+ CD25^{high}$ -Zellen waren positiv für CD45RO. D: Messung der CD45RA-positiven Zellen. Nur ein sehr geringer Teil der hier analysierten $CD4^+ CD25^{high}$ -Zellen konnte als CD45RA-positiv charakterisiert werden. E: Messung der CD127-positiven Treg. Nahezu alle Zellen waren wie erwartet nur schwach positiv für diesen Marker. F: Messung der CD27 positiven Treg. Diese Abbildung zeigt eine positive und eine deutlich kleinere negative Population für diesen Marker. G: Messung der CD85j positiven Treg. Nahezu alle gemessenen Treg waren schwach positiv.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die in dieser Arbeit gemessenen Zellen zu 70,8- 98,4% positiv für die in der Literatur beschriebenen Memory-Treg spezifischen Marker waren.

3.1.1 Validierung der Treg-Messprotokolle anhand eines Vergleichs der prozentualen und absoluten Treg-Zahlen im peripheren Blut von BK-Patienten und normalen Spendern

Da es Unterschiede zwischen Patienten mit soliden Tumoren und solchen mit hämatologischen Erkrankungen bezüglich der Treg-Zahlen zu geben scheint, wurden in dieser Arbeit zunächst Proben von Patienten mit soliden Tumoren (Bronchialkarzinompatienten) mit denen von normalen Spendern verglichen um die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse für solide Tumore zu bestätigen und somit eine Kontrolle für den Vergleich der Proben von Patienten mit hämatologischer Erkrankung (MM-Patienten) und solchen mit soliden Tumoren (BK-Patienten) zu erstellen. Für die Gruppe der Patienten mit soliden Tumoren wurden Bronchialkarzinompatienten gewählt, da diese Blutproben in der Arbeitsgruppe zur Verfügung standen und es bereits genügend Literatur über Treg bei dieser Erkrankung gab.

Da die gemessenen Daten nicht unbedingt der Normalverteilung folgen, wurde die Darstellung anhand von Boxplots gewählt (siehe Abbildung 2.3). Wurden hier oder in den folgenden Auswertungen zwei oder mehr Proben eines Patienten derselben Gruppe zugeordnet, wurde der Median dieser Werte gebildet und ging in die Auswertung ein. Die absoluten Zellzahlen/ μl wurden über die in dem jeweiligen Blutbild angegebene Lymphozytenzahl/ μl berechnet. Fehlte die Lymphozytenzahl/ μl in einem der Blutbilder, so konnten keine absoluten Zellzahlen errechnet werden. Dadurch bedingt kann es bei einigen Abbildungen zu Unterschieden zwischen der Fallzahl der prozentualen und der Fallzahl der absoluten Zellzahlen kommen.

Im Folgenden wurde ein Vergleich der Blutproben von 13 unbehandelten BK-Patienten (9 männlich, 4 weiblich, darunter 10 Patienten mit NSCLC und 3 Patienten mit SCLC) mit 11 Blutproben von normalen Spendern (2 männlich, 9 weiblich) durchgeführt, um Rückschlüsse auf den Unterschied der Treg-Werte von MM-Patienten und BK-Patienten ziehen zu können. Abbildung 3.3 A zeigt den Vergleich der prozentualen Treg-Zahlen. Für die Gruppe der normalen Spender lag dieser Wert bei im Median 4,1% (2,51-6,61), für unbehandelte Patienten mit Bronchialkarzinom konnte ein signifikant höherer Wert ($p=0,008$) von 5,85% (3,75-16,59) ermittelt werden. Die absoluten Treg-Zahlen (B) lagen bei normalen Spendern bei 56,1

Treg/ μ l (25,12-159,58), bei BK-Patienten bei 55,01 Treg/ μ l (25,38-145,15). Ein signifikanter Unterschied konnte hier nicht festgestellt werden ($p=0,977$).

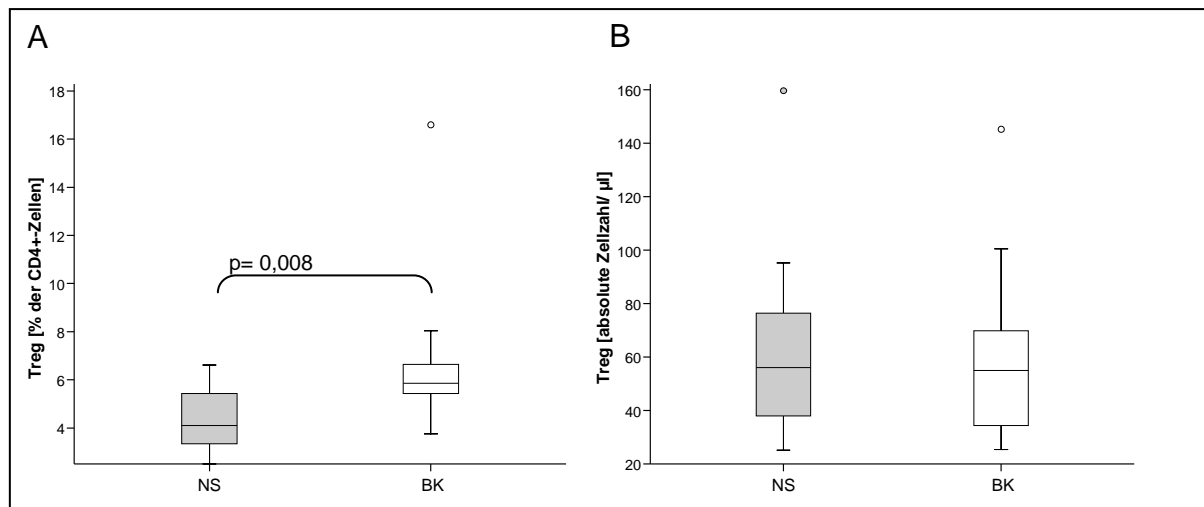


Abbildung 3.3: Relative und absolute Treg-Zahlen im peripheren Blut von unbehandelten BK-Patienten verglichen mit denen von normalen Spendern

A: Vergleich der prozentualen Treg-Werte. Für Patienten mit Bronchialkarzinom konnte ein signifikant höherer Wert im Vergleich zu normalen Spendern festgestellt werden.

Fallzahlen: NS: n=11; BK: n=13

B: Absolute Treg-Zahlen. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied.

Fallzahlen: NS: n=11; BK: n=13

3.1.2 Quantitiver Vergleich der Treg-Zellen im peripheren Blut von normalen Spendern und MM-Patienten

Nachdem 37 Blutproben von 31 MM-Patienten (19 männlich, 12 weiblich) analysiert worden waren (siehe 2.3), wurden zunächst die prozentualen Anteile der Treg an der CD4-positiven Zellfraktion der bereits beschriebenen 11 normalen Spender (2 männlich, 9 weiblich) und der MM-Patienten im peripheren Blut verglichen. Bei dieser Auswertung wurde keine Unterteilung der Patienten hinsichtlich der verschiedenen Therapien durchgeführt, auch Patienten ohne Behandlung wurden in dieser Analyse berücksichtigt. Abbildung 3.4 A zeigt den prozentualen Vergleich von Treg bei normalen Spendern und MM-Patienten. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,003$) zwischen normalen Spendern (Median: 4,1% (2,51-6,61)) und MM-Patienten (Median: 7,05% (2,26-17,3)), wobei die MM-Patienten einen signifikant erhöhten Treg-Anteil zeigten. Beim Vergleich der absoluten Zellzahlen konnte eine Tendenz zu niedrigeren Zellzahlen bei den MM-Patienten (Median: 32,38 Treg/ μ l (2,76-108,82)) im Vergleich zu normalen Spendern (Median: 56 Treg/ μ l (25,12-159,58)) beobachtet werden. Es ergab sich aber kein signifikanter Unterschied ($p=0,051$; Abb. 3.4 B).

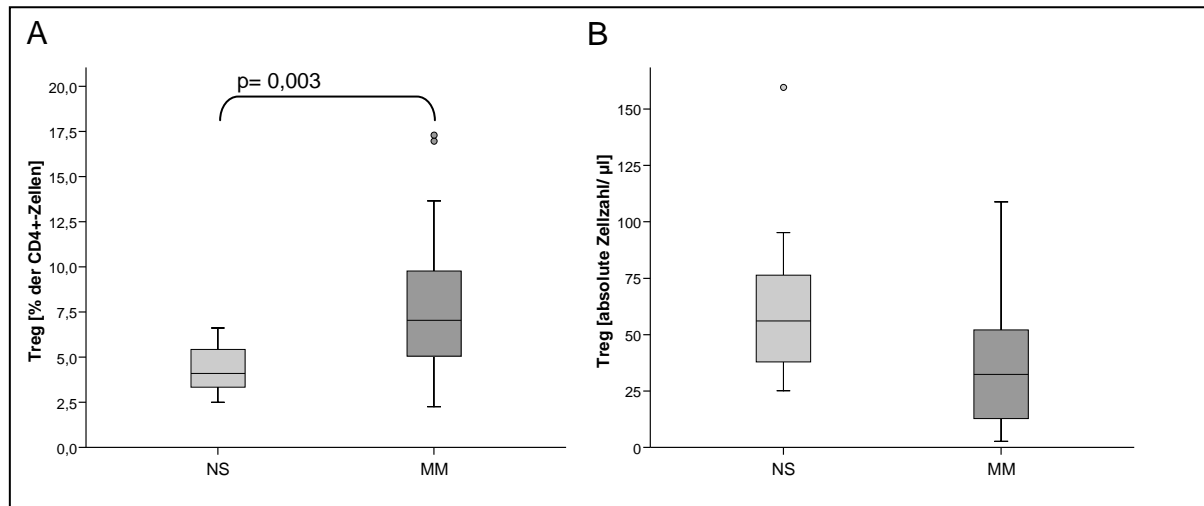


Abbildung 3.4: Quantitativer Vergleich der Treg im peripheren Blut normaler Spender und MM-Patienten.

A: Prozentualer Vergleich der Treg bei normalen Spendern und MM-Patienten. Der Treg Prozentsatz bei den MM-Patienten war signifikant erhöht.

Fallzahlen: NS: n=11; MM: n=31

B: Absolute Zellzahlen der Treg. Tendenziell ist die Anzahl der Treg bei den MM-Patienten niedriger als bei normalen Spendern. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Fallzahlen: NS: n=11; MM: n=24

Um den Einfluß der bei MM-Patienten durchgeführten Therapien auf die oben beschriebene Analyse zu überprüfen, wurde eine weitere Auswertung durchgeführt, bei der nur Blutproben von MM-Patienten berücksichtigt wurden, die bislang noch keiner Therapie unterzogen wurden. Wie in Abbildung 3.5 zu sehen ist, zeigten sich hierbei keine signifikanten Unterschiede in den Prozentzahlen der Treg ($p=0,7$). Für die normalen Spender ergab sich ein Median von 4,1% (2,51-6,61) im Vergleich zu 4,46% (1,18-5,73) für die MM-Patienten. Die absoluten Treg-Zellzahlen zeigten eine Tendenz zu niedrigeren Zellzahlen bei den MM-Patienten, wobei auch dieser Unterschied mit 56 Treg/ μ l (25,12-159,58) bei den normalen Spendern im Vergleich zu 42,19 Treg/ μ l (27,41-60,06) bei den MM-Patienten nicht signifikant war ($p=0,7$). Möglicherweise ist dies auf die geringe Fallzahl ($n=3$) im Bezug auf die Proben der MM-Patienten zurückzuführen.

Vergleicht man die Abbildungen 3.4 und 3.5 miteinander, so scheint die erhöhte prozentuale Treg-Zahl in Abbildung 3.4 eher auf die Therapie der Patienten zurückzuführen zu sein als auf einen Einfluß der Krankheit.

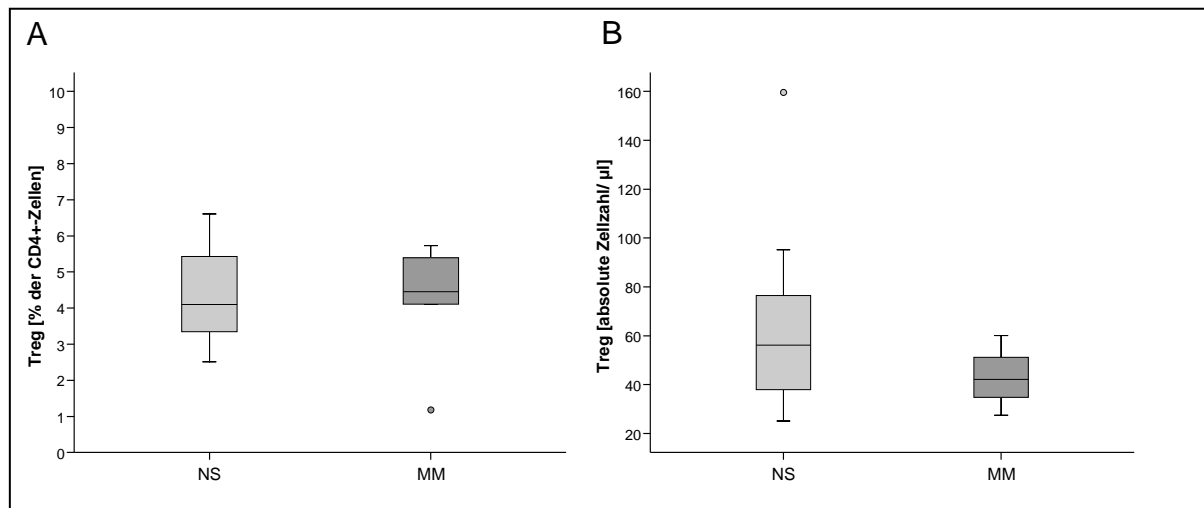


Abbildung 3.5: Quantitativer Vergleich der Treg im peripheren Blut normaler Spender und unbehandelter MM-Patienten.

A: Prozentualer Vergleich der Treg bei normalen Spendern und unbehandelten MM-Patienten. Der Treg Prozentsatz bei den MM-Patienten und normalen Spendern war nicht signifikant unterschiedlich.

Fallzahlen: NS: n=11; MM: n=6

B: Vergleich der absoluten Zellzahlen der Treg. Tendenziell war die Anzahl der Treg bei den MM-Patienten auch hier niedriger als bei normalen Spendern. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Fallzahlen: NS: n=11; MM: n=3

3.1.3 Einfluß der Therapie und verschiedener Krankheitsparameter von MM-Patienten auf die prozentuale und absolute Treg-Zahl im peripheren Blut

Um den Einfluß der Therapie auf die Anzahl der Treg bei MM-Patienten genauer zu analysieren, wurden nun Proben von Patienten ohne Therapie (ohne) mit solchen von Patienten mit Chemotherapie (CTX) und solchen von Patienten mit Hochdosis-Chemotherapie (HD-CTX) verglichen. Zwischen der jeweiligen Therapie und dem Zeitpunkt der Probenentnahme lag ein Zeitraum von mindestens einem Monat. Abbildung 3.6 A zeigt die Ergebnisse des Vergleiches der prozentualen Anteile der Treg an den CD4-positiven Zellen. Vergleicht man Proben von Patienten ohne Therapie mit solchen von Patienten, die einer CTX unterzogen wurden, so zeigten sich signifikant erhöhte Werte ($p=0,046$) bei der Gruppe mit CTX (unbehandelte MM-Patienten: Median: 4,46% (1,18-5,73); Patienten mit CTX: Median: 10,14% (3,17-27,24)). Auch bei einem Vergleich der Gruppe ohne Therapie mit der Gruppe mit HD-CTX (Median: 8,3%) konnten signifikant erhöhte Werte ($p=0,021$) bei der Gruppe mit HD-CTX festgestellt werden (unbehandelte MM-Patienten: Median: 4,46% (1,18-5,73); Patienten mit HD-CTX: Median: 8,3% (2,26-17,3)). Kein signifikanter Unterschied ergab sich bei dem Vergleich der Gruppen CTX und HD-CTX

untereinander ($p=0,68$). Abbildung 3.6 B zeigt die Ergebnisse des Vergleiches der absoluten Treg-Zellzahlen. Bei keiner der Gruppen konnte ein signifikanter Unterschied bei einem Vergleich mit einer der anderen Gruppen festgestellt werden (Vergleich der Gruppen „ohne Therapie“ und „CTX“: $p=0,569$; Vergleich der Gruppen „ohne Therapie“ und „HD-CTX“: $p=0,314$; Vergleich der Gruppen „CTX“ und „HD-CTX“: $p=0,307$). Tendenziell zeigte sich aber eine Abnahme der absoluten Treg-Zellzahlen von der Gruppe ohne Therapie (Median: 42,19 Treg/ μ l (27,41-60,06)) zur Gruppe mit CTX (Median: 35,7 Treg/ μ l (18,77-60,72)) und weiter zur Gruppe mit HD-CTX (Median: 21,12 Treg/ μ l (2,76-108,82)). Ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe ohne Therapie und den Gruppen mit Therapie ist möglicherweise aufgrund der geringen Fallzahl der Gruppe ohne Therapie ($n=3$) hier nicht zu sehen.

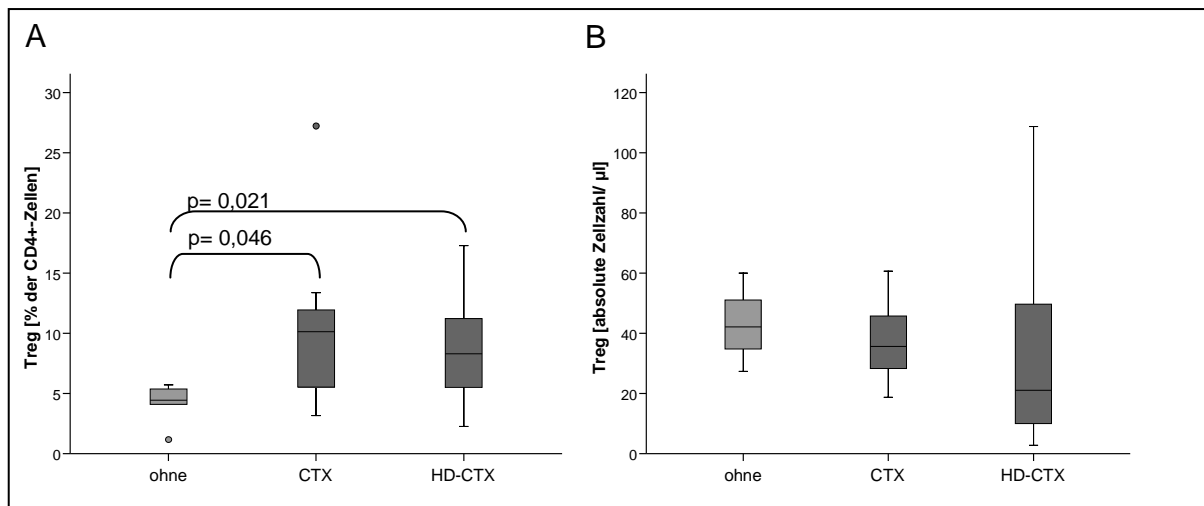


Abbildung 3.6: Quantitativer Vergleich der Treg im peripheren Blut von unbehandelten MM-Patienten, Patienten mit CTX und Patienten mit HD-CTX.

A: Prozentualer Vergleich zwischen unbehandelten MM-Patienten, Patienten mit CTX und Patienten mit HD-CTX. Es konnten signifikant höhere Werte bei den Patientengruppen mit CTX bzw. HD-CTX im Vergleich zu der Gruppe ohne Therapie festgestellt werden. Die Patientengruppen mit CTX und mit HD-CTX zeigten keinen signifikanten Unterschied untereinander.

Fallzahlen: ohne: $n=6$; CTX: $n=7$; HD-CTX: $n=17$

B: Die absoluten Treg-Zahlen für die Gruppen ohne Therapie, mit CTX und mit HD-CTX zeigten keinen signifikanten Unterschied.

Fallzahlen: ohne: $n=3$; CTX: $n=7$; HD-CTX: $n=15$

Zusammenfassend kann man sagen, dass die in Abbildung 3.6 dargestellten Ergebnisse signifikant erhöhte prozentuale Treg-Werte nach Therapie zeigten. Ein Unterschied der Treg-Zahlen zwischen den Gruppen CTX und HD-CTX wurde nicht gefunden.

Um die oben dargestellten Ergebnisse weitergehend analysieren zu können, wurden zusätzlich zu den Treg auch die absoluten Zellzahlen der CD4⁺- und CD8⁺-Zellen bei denselben MM-Patienten ohne Therapie, mit CTX und mit HD-CTX aufgetragen (Abb. 3.7) und mit denen für die Treg verglichen.

Für die absoluten Zahlen der CD4⁺-Zellen ergaben sich hierbei bei keinem der Vergleiche zwischen den Gruppen ohne, CTX und HD-CTX signifikante Unterschiede (unbehandelte MM-Patienten: Median: 781,98 CD4⁺-Zellen/ μ l (618,28-1181,25); Gruppe mit CTX: Median: 380,48 CD4⁺-Zellen/ μ l (240,85-839,86); Gruppe mit HD-CTX: Median: 442,82 CD4⁺-Zellen/ μ l (23,74-979,90)). Tendenziell ist aber ein höherer Wert für die Gruppe ohne Therapie zu erkennen. Möglicherweise ist ein signifikanter Unterschied aufgrund der niedrigen Fallzahl für die Gruppe „ohne Therapie“ (n=3) nicht zu erkennen. Beim Vergleich der Gruppen CTX und HD-CTX ließ sich kein tendenzieller Unterschied ableiten. Die p-Werte für die jeweiligen Vergleiche lauteten wie folgt: Vergleich der Gruppe „ohne Therapie“ und „CTX“: p=0,138; Vergleich der Gruppe „ohne Therapie“ und „HD-CTX“: p=0,074; Vergleich der Gruppe „CTX“ und „HD-CTX“: p=0,738.

Beim Vergleich der Therapiegruppen untereinander im Bezug auf die CD8⁺-Zellen konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (unbehandelte MM-Patienten: Median: 531,74 CD8⁺-Zellen/ μ l (265,30-809,11); Gruppe mit CTX: Median: 381,47 CD8⁺-Zellen/ μ l (191,46-650,76); Gruppe mit HD-CTX: Median: 511,08 CD8⁺-Zellen/ μ l (20,10-2747,00)). Tendenziell ist aber ein leicht höherer Wert für die Gruppe ohne Therapie im Vergleich zur Gruppe mit CTX zu sehen. Auch hier ist eine Signifikanz möglicherweise durch die niedrige Fallzahl der Gruppe ohne Therapie (n=3) nicht zu erkennen. Aufgrund der sehr starken Abweichungen bei der Gruppe mit HD-CTX lässt sich hier keine Tendenz ableiten. Die p-Werte für die jeweiligen Vergleiche lauteten wie folgt: Vergleich der Gruppe „ohne Therapie“ und „CTX“: p=0,571; Vergleich der Gruppe „ohne Therapie“ und „HD-CTX“: p=0,720; Vergleich der Gruppe „CTX“ und „HD-CTX“: p=0,070.

Vergleicht man die absoluten Zellzahlen der Treg (Abb.3.6 B) mit denen der CD4⁺- und CD8⁺-Zellen (Abb.3.7), so fällt auf, dass alle drei Populationen eine höhere mediane Zellzahl in der Gruppe ohne Therapie aufweisen.

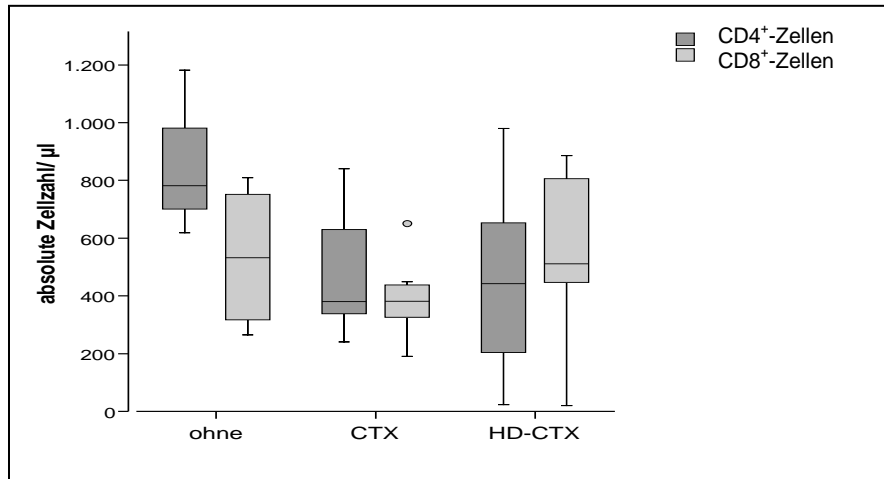


Abbildung 3.7: Absolute Zellzahlen der CD4⁺- und CD8⁺-Zellen bei MM-Patienten ohne Therapie, mit CTX und mit HD-CTX im peripheren Blut.

Tendenziell war ein höherer Wert für die absoluten Zellzahlen der CD4⁺-Zellen bei der Gruppe ohne Therapie im Vergleich zu den Gruppen CTX und HD-CTX zu beobachten. Es konnten allerdings keine signifikanten Unterschiede errechnet werden. Auch im Bezug auf die CD8⁺-Zellen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen errechnet werden.

Fallzahlen für CD4⁺-Zellen: ohne Therapie: n=3; CTX: n=7; HD-CTX: n=15

Fallzahlen für CD8⁺-Zellen: ohne Therapie: n=3; CTX: n=7; HD-CTX: n=15

Im Weiteren wurde der Einfluß des Krankheits-Stadiums, in dem sich die Patienten zum Zeitpunkt der Probenentnahme befanden, auf die Treg-Zahlen überprüft. Die Patientenproben wurden hierzu in drei Gruppen nach den Stadien 1, 2 und 3 nach Durie und Salmon (Durie and Salmon; 1975) aufgeteilt und die prozentualen und absoluten Zahlen für die Treg-Zellen aufgetragen (Abb. 3.8 A und B). Wie in Abbildung A und B zu sehen ist, konnten hier weder bei der Analyse der prozentualen noch bei der der absoluten Zahlen ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Prozentual ergab sich für die Gruppe Stadium 1 ein Median von 4,48% (4,43-5,73), für die Gruppen Stadium 2 und 3 ergab sich ein leicht höherer Wert von im Median 7,02% (2,38-17,3) bzw. 7,34% (2,26-16,97) Treg von den CD4⁺-Zellen. Die p-Werte zu den prozentualen Vergleichen lauteten: Vergleich Stadium 1 und Stadium 2: p=0,186; Vergleich Stadium 1 und Stadium 3: p=0,176; Vergleich Stadium 2 und Stadium 3: p=0,944. Die absoluten Treg-Zahlen betrugen für die Gruppe Stadium 1 im Median 43,73 Treg/µl (27,41-60,06), für die Gruppen Stadium 2 und 3 ergaben sich die Werte 30,31 Treg/µl (7,37-64,68) bzw. 31,23 Treg/µl (2,76-108,82). Die p-Werte für die Vergleiche der absoluten Zahlen lauteten: Vergleich Stadium 1 und Stadium 2: p=0,390; Vergleich Stadium 1 und Stadium 3 p=0,602; Vergleich Stadium 2 und Stadium 3: p=1. Aus diesen Daten ließ sich also kein Einfluß des Krankheitsstadiums auf die Treg-Zahlen

ableiten. Die Fallzahlen der Gruppe Stadium 1 waren hierbei allerdings sehr gering (prozentual: n=3; absolut: n=2).

Eine weitere Unterteilung der Patienten erfolgte anhand der Aktivität der Krankheit zum Zeitpunkt der Probenentnahme. Die Aktivität der Krankheit wurde folgendermaßen definiert: Alle Patientenproben waren hinsichtlich des Paraproteins analysiert worden. War dieses Protein über den Referenzbereich erhöht (Referenzbereich IgG: 7,5-15,6 g/l; IgA: 0,82-4,53 g/l; Kappa freie Leichtketten: 3,3-19,4 mg/l; Lambda freie Leichtketten: 5,71-26,3 mg/l), so wurde von einer aktiven Krankheit ausgegangen. Konnte hingegen nur eine schwache Erhöhung (1-2x über den Normalwerten) oder Normalwerte gemessen werden, so wurde die Krankheit als nicht aktiv eingestuft. Des Weiteren wurde der klinische Krankheitsverlauf der Patienten mit Hilfe der behandelnden Ärzte analysiert und in der Einstufung berücksichtigt. Die Abbildungen 3.8 C und D stellen den Vergleich zwischen der Patientengruppe mit aktiver und der mit nicht aktiver Krankheit dar. Hierbei ergab sich für die Gruppe mit aktiver Krankheit prozentual ein Treg-Wert von im Median 6,21% (4,56-9,41) im Vergleich zu der Gruppe mit nicht aktiver Krankheit (Median: 7,36% (2,26-17,3)). Die absoluten Treg-Zahlen lagen bei der Gruppe mit aktiver Krankheit bei im Median 36,78 Treg/ μ l (9,53-93,08) im Vergleich zu der Gruppe mit nicht aktiver Krankheit (Median: 33,37 Treg/ μ l (4,34-108,82)). Weder prozentual ($p=0,363$) noch absolut ($p=0,760$) konnten demnach signifikante Unterschiede festgestellt werden.

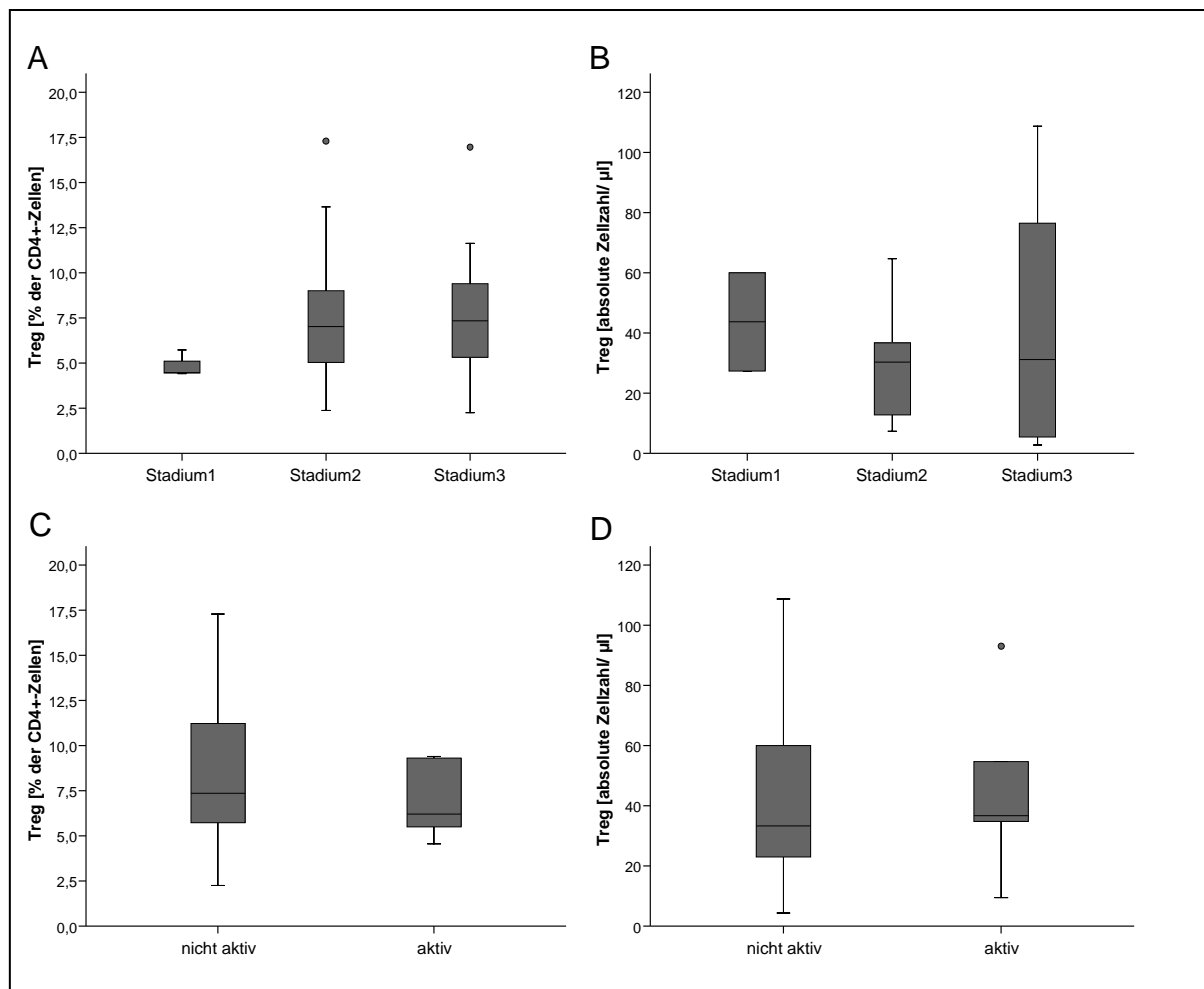


Abbildung 3.8: Analyse der Treg Zahlen im Bezug auf die Krankheitsstadien und die Aktivität der Krankheit im peripheren Blut von MM-Patienten.

A, B: Prozentuale und absolute Auswertung der Treg Zahlen im Bezug auf die Krankheitsstadien. Weder prozentual noch absolut konnte ein signifikanter Unterschied beim Vergleich der einzelnen Gruppen festgestellt werden. Da es sich bei den Treg-Zahlen für Stadium 1 nur um 2 Werte handelt, konnten hier keine 95% Konfidenzintervalle angegeben werden.

Fallzahlen Diagramm A: Stadium1: n=3; Stadium2: n=11; Stadium3: n=10

Fallzahlen Diagramm B: Stadium1: n=2; Stadium2: n=10; Stadium3: n=8

C, D: Prozentuale und absolute Auswertung der Treg Zahlen bezüglich einer aktiven bzw. nicht aktiven Krankheit. Auch hier sind keine signifikanten Unterschiede zu sehen.

Fallzahlen Diagramm A: nicht aktiv: n=17; aktiv: n=6

Fallzahlen Diagramm B: nicht aktiv: n=15; aktiv: n=5

Zusammenfassend konnte bei der für diese Arbeit durchgeführten Analyse des peripheren Blutes von MM-Patienten kein signifikanter Unterschied beim auf Krankheitsparameter bezogenen Vergleich der Treg-Zahlen festgestellt werden. Da diese Analysen bislang nur die Situation im peripheren Blut der Patienten widerspiegelt, sich die Krankheit aber primär im Knochenmark manifestiert, wurden zusätzlich Knochenmarkproben von MM-Patienten analysiert.

3.1.4 Quantitativer Vergleich der Treg im Knochenmark und im peripheren Blut von MM-Patienten

Im Folgenden wurden die oben genannten 37 peripheren Blutproben von 31 MM-Patienten (19 männlich, 12 weiblich) und zusätzliche 45 Knochenmarkproben von 31 MM-Patienten (20 männlich, 11 weiblich) analysiert. Hierzu wurden zunächst alle gemessenen Proben verwendet, ohne nach Therapien oder Krankheitsparametern zu unterscheiden. Verglichen wurden die prozentualen Treg-Zahlen, bei denen sich für das periphere Blut ein Wert von im Median 7,05% (2,26-17,3) und im Knochenmark ein Wert von im Median 4,6% (0,35-15,42) ergab. Die absoluten Treg-Zahlen betrugen im peripheren Blut im Median 32,38 Treg/ μ l (2,76-108,82) im Vergleich zum Knochenmark (Median: 8 Treg/ μ l (0,91-82)). Abbildung 3.9 zeigt die graphische Darstellung dieses Vergleiches. Bei der prozentualen Auswertung (Abb. 3.9 A) ergab sich ein signifikant niedrigerer Wert des Treg-Anteils an der CD4⁺-Fraktion für die Knochenmarkproben ($p=0,011$) im Vergleich zum peripheren Blut. Auch die absoluten Treg-Zahlen waren im Knochenmark signifikant niedriger als im peripheren Blut ($p=0,000$).

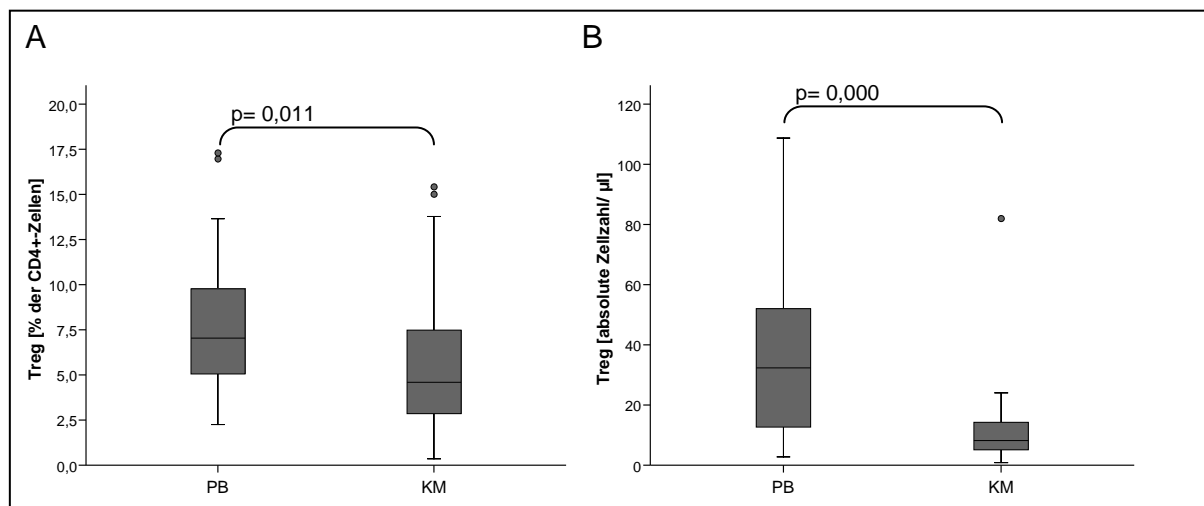


Abbildung 3.9: Vergleich der prozentualen und absoluten Treg-Zahlen im peripheren Blut und im Knochenmark von MM-Patienten.

A: Prozentualer Vergleich der Treg-Zahlen zwischen peripherem Blut und Knochenmark von MM-Patienten. Die statistische Analyse der Daten ergab einen signifikant niedrigeren Wert für die Knochenmarkproben.

Fallzahlen: PB: n=31; KM: n=28

B: Vergleich der absoluten Treg-Zahlen. Der Wert für das Knochenmark ist signifikant niedriger.

Fallzahlen: PB: n=24; KM: n=23

Die Erwartung erhöhter Treg-Anteile bzw. -Zahlen im Knochenmark, da sich hier der Ursprung der Krankheit befindet, konnte anhand dieser Analyse nicht bestätigt

werden. Stattdessen ergab sich prozentual und absolut ein signifikant niedrigerer Wert der Treg-Zahlen in den analysierten Knochenmarkproben.

3.1.5 Einfluß der Therapie und verschiedener Krankheitsparameter von MM-Patienten auf die prozentuale und absolute Treg-Zahl im Knochenmark

Die 45 Knochenmarkproben der 31 MM-Patienten wurden hinsichtlich der verschiedenen Therapien in die oben beschriebenen Gruppen „ohne Therapie“, „CTX“ und „HD-CTX“ unterteilt, um einen eventuell durch verschiedene Therapien verursachten Unterschied der Treg-Zahlen im Knochenmark sichtbar zu machen. In Abbildung 3.10 sind die prozentualen (A) und absoluten (B) Treg-Werte dargestellt. Die statistischen Analysen ergaben keinen signifikanten Unterschied beim Vergleich der in Abbildung A und B dargestellten Gruppen. Weder in den prozentualen Zahlen (im Median: ohne: 4,12% (0,35-10,06); CTX: 5,03% (2,88-7,12); HD-CTX: 4,94% (0,51-32,48)) noch in den absoluten Zahlen (im Median: ohne: 9,59 Treg/ μ l (4,16-82); CTX: 16,41 Treg/ μ l (11,17-24,43); HD-CTX: 8,16 Treg/ μ l (0,91-24,05)) konnte ein Unterschied in der Treg-Zahl bezüglich einer CTX oder HD-CTX festgestellt werden (Vergleich Gruppe „ohne“ und Gruppe „CTX“: prozentual: $p=0,947$, absolut: $p=0,439$; Vergleich Gruppe „ohne“ und Gruppe „HD-CTX“: prozentual: $p=0,681$, absolut: $p=0,779$; Vergleich Gruppe „CTX“ und Gruppe „HD-CTX“: prozentual: $p=0,881$, absolut: $p=0,101$). Im Gegensatz zu den im peripheren Blut gezeigten Ergebnissen konnte im Knochenmark auch beim Vergleich von therapierten Patienten (Gruppen „CTX“ und „HD-CTX“) mit untherapierten Patienten (Gruppe „ohne“) kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Auch eine dahingehende Tendenz konnte im Knochenmark nicht beobachtet werden (Fallzahl der Gruppe „CTX“ in Abbildung B: $n=3$).

Im Blut wurde demnach ein Unterschied in der prozentualen Treg-Zahl gefunden, wenn Proben von therapierten und nicht therapierten Patienten verglichen wurden. Im Knochenmark hingegen war dieser Unterschied nicht festzustellen.

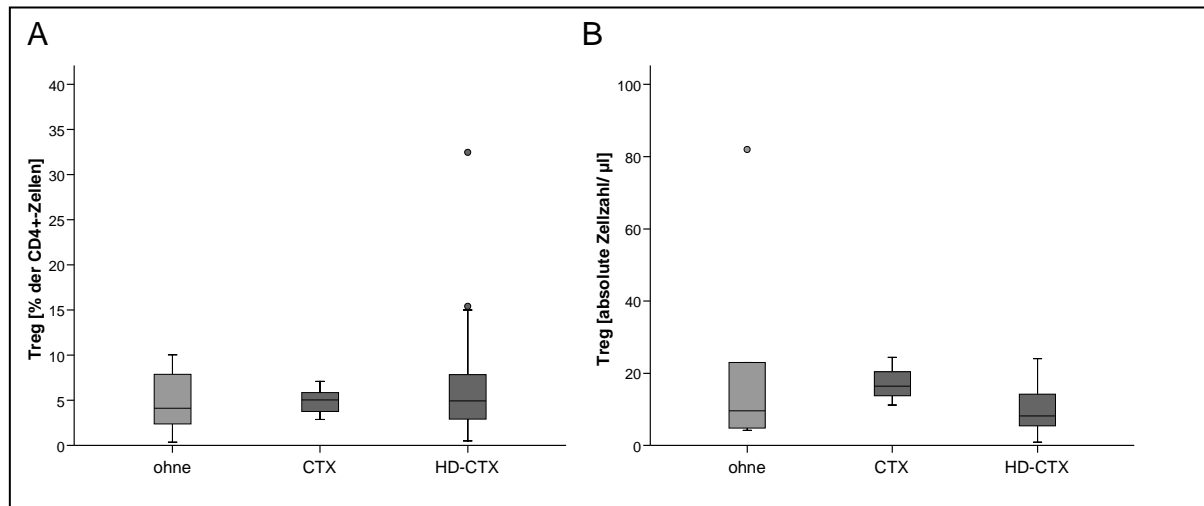


Abbildung 3.10: Vergleich der prozentualen und absoluten Treg-Zahlen im Knochenmark bei MM-Patienten ohne Therapie, mit CTX und mit HD-CTX.

A: Prozentualer Vergleich der Treg-Zahlen. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Therapiegruppen CTX und HD-CTX festgestellt werden. Auch der Vergleich von therapierten und untherapierten Patienten ergab keine signifikanten Unterschiede.

Fallzahlen: ohne Therapie: n=9; CTX: n=5; HD-CTX: n=18

B: Vergleich der absoluten Treg-Zahlen bei den Gruppen ohne Therapie, mit CTX und mit HD-CTX. Auch hier konnten keine signifikanten Unterschiede errechnet werden.

Fallzahlen: ohne Therapie: n=6; CTX: n=3; HD-CTX: n=17

Um diese Daten besser beurteilen zu können, wurden analog zur Auswertung der Ergebnisse der Treg-Zahlen im peripheren Blut auch hier die CD4⁺- und CD8⁺-Zellen derselben MM-Patienten zusätzlich analysiert (Abb. 3.11).

Signifikante Unterschiede zwischen den Therapiegruppen wurden nur im Bezug auf die CD4⁺-Zellen gefunden. Die Gruppe CTX weist hier signifikant höhere Werte auf als die Gruppe HD-CTX (p=0,013). Eine Tendenz zur höheren CD4⁺-Zellzahl bei untherapierten im Vergleich zu therapierten Patienten konnte hier aufgrund der starken Abweichungen in der Patientengruppe ohne Therapie nicht festgestellt werden (unbehandelte MM-Patienten: Median: 267,15 CD4⁺-Zellen/µl (60,12-1394,23); Gruppe mit CTX: Median: 417,14 CD4⁺-Zellen/µl (326,54-451,78); Gruppe mit HD-CTX: Median: 179,54 CD4⁺-Zellen/µl (38,01-409,86)). Die p-Werte für diese Vergleiche lauteten: Vergleich Gruppe „ohne Therapie“ und Gruppe „CTX“: p=0,606; Vergleich Gruppe „ohne Therapie“ und Gruppe „HD-CTX“: p=0,294.

Die Auswertung der CD8⁺-Zellzahlen ergab keine Unterschiede zwischen den Therapiegruppen (unbehandelte MM-Patienten: Median: 462,87 CD8⁺-Zellen/µl (1134,99-781,30); Gruppe mit CTX: Median: 497,83 CD8⁺-Zellen/µl (493,61-502,04); Gruppe mit HD-CTX: Median: 465,47 CD8⁺-Zellen/µl (165,10-951,60)). Die p-Werte für diese Vergleiche lauteten: Vergleich Gruppe „ohne Therapie“ und Gruppe „CTX“:

p=1; Vergleich Gruppe „ohne Therapie“ und Gruppe „HD-CTX“: p=0,944; Vergleich Gruppe „CTX“ und Gruppe „HD-CTX“: p=0,790.

In beiden Auswertungen waren die Fallzahlen der Gruppe „CTX“ nur gering (p=3 bzw. 2).

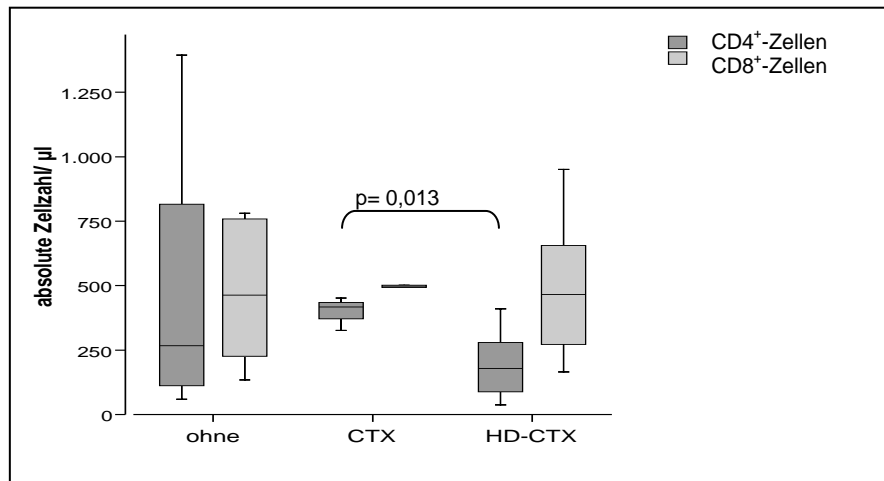


Abbildung 3.11: Absolute Zellzahlen der CD4⁺- und CD8⁺-Zellen bei MM-Patienten ohne Therapie, mit CTX und mit HD-CTX im Knochenmark.

Für die CD4⁺-Zellen konnte ein signifikant höherer Wert für die Gruppe CTX im Vergleich zur Gruppe HD-CTX ermittelt werden. Der Vergleich von untherapierten und therapierten Patienten ergab keine signifikanten Unterschiede. Für die CD8⁺-Zellen konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen „ohne“, „CTX“ und „HD-CTX“ ermittelt werden.

Fallzahlen für CD4⁺-Zellen: ohne Therapie: n=6; CTX: n=3; HD-CTX: n=17

Fallzahlen für CD8⁺-Zellen: ohne Therapie: n=6; CTX: n=2; HD-CTX: n=17

Außer dem Vergleich der verschiedenen Therapiegruppen wurde auch der Einfluß verschiedener Krankheitsparameter auf die Treg-Zahlen im Knochenmark untersucht. Hierzu wurden die Patienten analog zu der Analyse des peripheren Blutes in folgende Gruppen eingeteilt: Zunächst wurde die Unterteilung nach Krankheitsstadien 1, 2 und 3 nach Durie und Salmon (Durie and Salmon; 1975) durchgeführt. Parallel wurde auch hier eine Unterteilung in aktive und nicht aktive Krankheit vorgenommen. Abbildung 3.12 zeigt die zugehörige graphische Darstellung der Ergebnisse. Wie im peripheren Blut bereits beobachtet, konnte für die prozentualen Zahlen kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (Abb. 3.12A; Vergleich Stadium1 und Stadium2: p=0,496; Vergleich Stadium1 und Stadium3: p=0,805; Vergleich Stadium2 und Stadium3: p=0,469). Für die Gruppe Stadium1 ergab sich ein Wert von im Median 3,61% (0,35-9,29), für die Gruppen Stadium 2 und 3 wurden Mediane von 5,03% (2,12-19,17) bzw. 4,2% (0,51-15,01) bestimmt. Auch die absoluten Treg-Zahlen (Abb. 3.12B) zeigten keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der Krankheitsstadien (Vergleich Stadium1 und Stadium2: p=0,142; Vergleich Stadium1 und Stadium3:

$p=0,794$; Vergleich Stadium2 und Stadium3: $p=0,271$). Die Werte hierfür lauten: Gruppe Stadium 1: 4,86 Treg/ μ l (4,33-16,41), Stadium 2: 11,17 Treg/ μ l (1,33-24,05), Stadium 3: 7,73 Treg/ μ l (0,91-23,41).

Auch der Vergleich der aktiven und nicht aktiven Krankheit zeigte weder prozentual (nicht aktiv: 5,06% (0,35-15,42); aktiv: 6,03% (0,51-19,17)) noch absolut (nicht aktiv: 5,42 Treg/ μ l (3,35-23,41); aktiv: 11,17 Treg/ μ l (0,91-82)) einen signifikanten Unterschied. Die p-Werte hierzu lauten: Prozentual: $p=0,482$, absolut: $p=0,217$. Auch im Knochenmark konnte also kein Einfluß von Krankheitsparametern auf die prozentualen und absoluten Treg-Zahlen nachgewiesen werden.

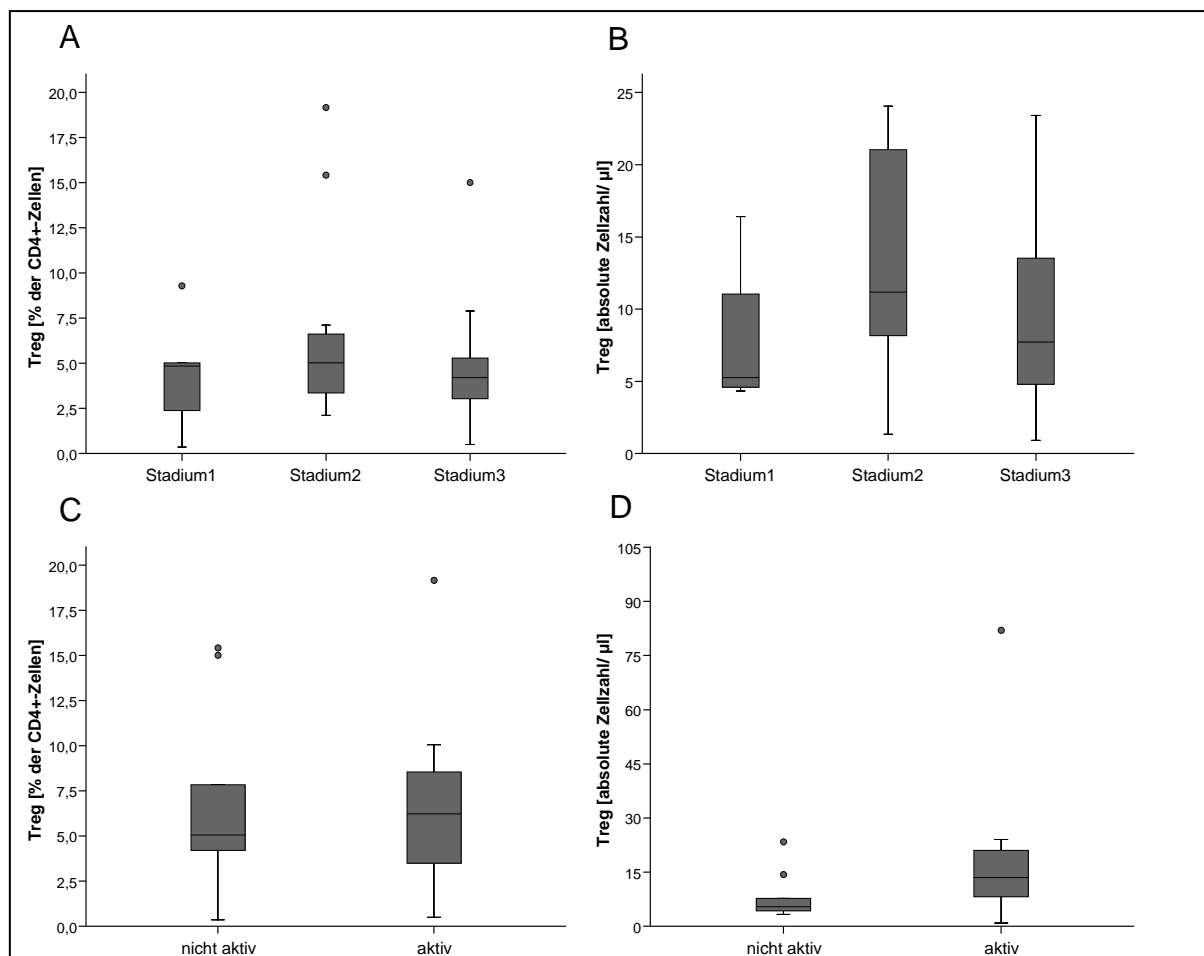


Abbildung 3.12: Treg-Zahlen im Knochenmark bezogen auf das Krankheitsstadium und die Aktivität der Krankheit.

A, B: Prozentualer Anteil der Treg an den CD4⁺-Zellen und absolute Zellzahlen aufgeteilt nach Krankheitsstadien. Weder für die prozentualen noch für die absoluten Werte konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen errechnet werden.

Fallzahlen prozentual: Stadium1: n=4; Stadium2: n=11; Stadium3: n=13

Fallzahlen absolut: Stadium1: n=3; Stadium2: n=9; Stadium3: n=11

C, D: Prozentuale und absolute Zellzahlen der Treg, aufgeteilt nach aktiver bzw. nicht aktiver Krankheit. Auch hier konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Werten für die Gruppen „nicht aktiv“ und „aktiv“ errechnet werden.

Fallzahlen prozentual: nicht aktiv: n=10; aktiv: n=12

Fallzahlen absolut: nicht aktiv: n=9; aktiv: n=11

3.1.6 Vergleich der prozentualen Anteile und absoluten Treg-Zahlen im peripheren Blut von Patienten mit Multiplen Myelom und Patienten mit solidem Tumor (Bronchialkarzinom)

Im Folgenden wurden die Treg-Zahlen im peripheren Blut von Patienten mit Multiplen Myelom mit denen von den oben genannten 13 Bronchialkarzinompatienten (BK; 9 männlich, 4 weiblich) verglichen. Für diesen Vergleich wurden sowohl bei den MM-Patienten als auch bei den Bronchialkarzinompatienten nur Proben von Patienten verwendet, die noch keiner Therapie unterzogen wurden. Die graphische Darstellung in Abbildung 3.13 A zeigt den Vergleich der prozentualen Anteile der Treg an der CD4⁺-Zellfraktion. Hierbei konnte ein signifikant höherer Wert von im Median 5,85% (3,75-16,59) für die Patientengruppe mit Bronchialkarzinom im Vergleich zu der Gruppe der MM-Patienten (im Median 4,46% (1,18-5,73) ermittelt werden ($p=0,028$). Der Vergleich der absoluten Zellzahlen (BK-Patienten im Median: 55,01 Treg/ μ l (25,38-145,15); MM-Patienten im Median: 42,19 Treg/ μ l (27,41-60,06); Abb. 3.13 B) zeigte hingegen keine signifikanten Unterschiede ($p=0,459$). Möglicherweise ist dies auf die niedrigen Fallzahlen für die absoluten Werte der MM-Patienten ($n=3$) zurückzuführen.

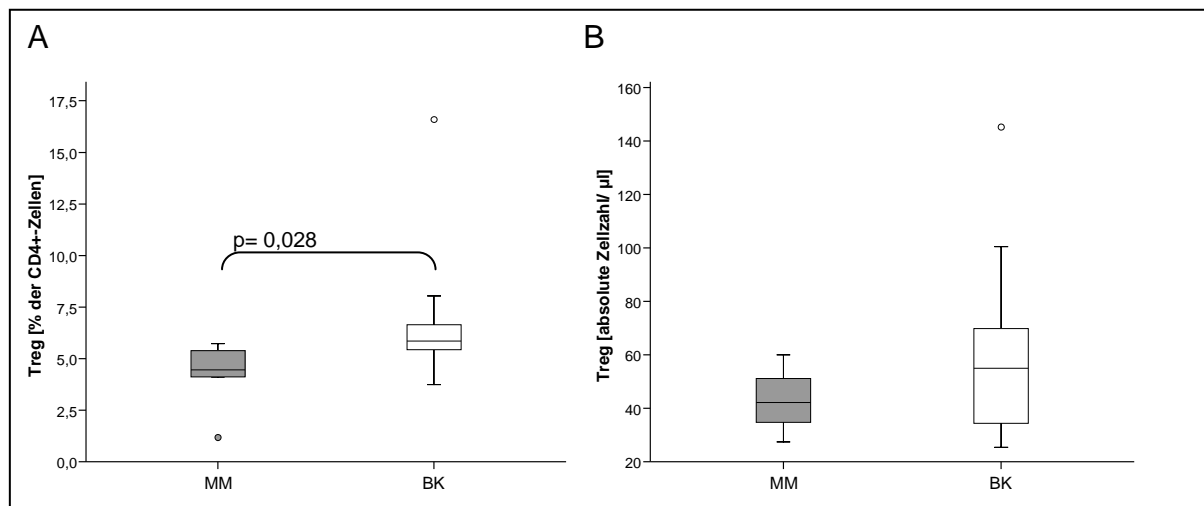


Abbildung 3.13: Analysen der relativen und absoluten Treg-Zahlen von unbehandelten MM-Patienten im Vergleich zu unbehandelten BK-Patienten.

A: Die prozentualen Treg-Zahlen zeigen einen signifikant höheren Wert für die BK-Patienten im Vergleich zu den MM-Patienten.

Fallzahlen: MM: $n=6$; BK: $n=13$

B: Die absoluten Treg-Zahlen sind nicht signifikant unterschiedlich

Fallzahlen: MM: $n=3$; BK: $n=13$

Die in Abbildung 3.3 und 3.13 dargestellten Ergebnisse zeigten, dass ein Unterschied zwischen den hier dargestellten Werten für MM-Patienten und denen für

an soliden Tumoren erkrankten Patienten bezüglich der prozentualen Treg-Zahl besteht. Im Vergleich zu normalen Spendern sind die prozentualen Treg-Zahlen im Blut der unbehandelten BK-Patienten erhöht. Im Gegensatz dazu tritt eine Erhöhung der prozentualen Treg-Werte bei den hier analysierten MM-Patienten nur dann auf, wenn die Patienten einer Chemotherapie unterzogen wurden.

3.2 Analyse der Treg-Werte bei zwei MM-Patienten vor, während und nach einer Immuntherapie

Außer den oben beschriebenen Analysen wurde eine Analyse der Treg-Werte im Verlauf einer Immuntherapie durchgeführt. Dabei handelte es sich um eine Behandlung, bei der Id-beladene dendritische Zellen als Vakzine eingesetzt wurden. Bislang wurde eine solche Therapie am Essener Universitätsklinikum bei zwei an Multiplem Myelom erkrankten Patienten durchgeführt. Einer dieser Patienten wurde im Rahmen einer klinischen Phase-I-Studie behandelt, die nur Patienten mit einem Paraprotein des Typs IgG einschloß (Pat.Nr.20). Ein weiterer Patient mit einem Paraprotein des Typs IgA wurde mit der gleichen Methode, im Rahmen eines individuellen Heilversuchs, behandelt (Pat.Nr.40). Die Treg-Werte dieser Patienten wurden im peripheren Blut bei HD-CTX, vor (V0; drei Monate nach HD-CTX) während (V1-3) und nach Abschluss der Vakzinierung (V4) gemessen. Da es in der Literatur Hinweise dafür gibt, dass die Treg-Zahl während einer solchen Immuntherapie steigen kann und somit einen Therapieerfolg negativ beeinflussen könnte (Banerjee et al. 2006; Fiore et al. 2005), war es interessant, den Verlauf der Treg unter der Vakzine zu protokollieren. Gemessen wurden die Treg sowohl als Prozent der CD4⁺-Fraktion (Abb. 3.14) als auch als absolute Zellzahlen (Abb. 3.15). Abbildung 3.14 zeigt einen erhöhten prozentualen Treg-Wert bei HD-CTX (Pat.Nr.20: 6,79%; Pat.Nr.40: 13,4%), wie bereits in Abbildung 3.6 für MM-Patienten gezeigt. Dieser Wert ging vor Vakzinierung (V0; 2-3 Monate nach HD-CTX) auf einen Wert von 5,39% für Pat.Nr.20 bzw. 6,61% für Pat.Nr.40 zurück. Während der Vakzinierung (Zeitpunkt V1-3) zeigte sich bei beiden Patienten ein Anstieg der prozentualen Treg-Werte (Pat.Nr.20: 4,95%, 8,93%, 10,2%; Pat.Nr.40: 7,27%, 10,6%, 12,91%). Nach Vakzinierung (V4) war ein weiterer Anstieg nur noch bei einem Patienten zu sehen (Pat.Nr.20: 11,79%; Pat.Nr.40: 11,82%).

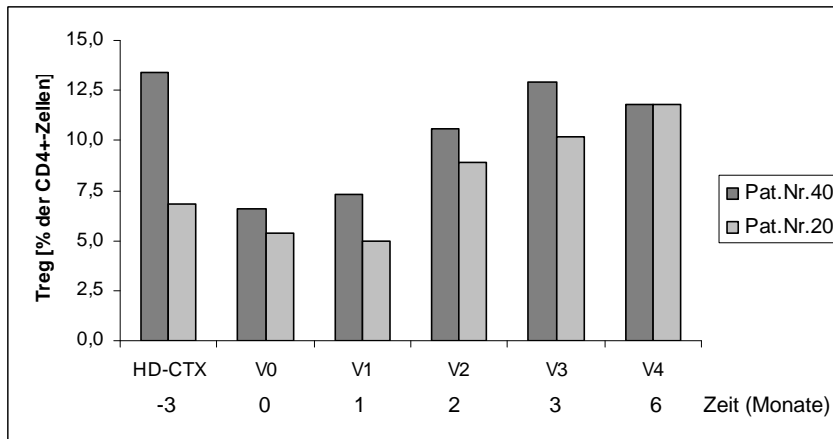


Abbildung 3.14: Prozentualer Verlauf der Treg Zahlen zweier MM-Patienten unter Immuntherapie

Bei HD-CTX ist der Wert im Vergleich zum Zeitpunkt V0 erhöht. Im Verlauf der Vakzinierung nehmen die Werte beider Patienten zu (V1-3). Nach Vakzinierung ist bei einem Patienten ein weiterer Anstieg zu sehen.

Da es sich hier bei beiden Patienten um Einzelwerte handelt konnten keine statistischen Analysen durchgeführt werden.

Abbildung 3.15 zeigt die zugehörigen absoluten Treg-Zahlen. Bei HD-CTX zeigte einer der Patienten höhere Werte als zum Zeitpunkt V0 (Pat.Nr.40: HD-CTX: 60,72 Treg/μl V0: 24 Treg/μl), der andere hingegen niedrigere (Pat.Nr.20: HD-CTX: 5,23 Treg/μl V0: 6,61 Treg/μl). Im Verlauf der Vakzinierung (V1-3) war auch hier ein Anstieg zu sehen (Pat.Nr.20: 11,29, 14,95, 16,76 Treg/μl; Pat.Nr.40: 25,33, 33,27, 42,03 Treg/μl). Nach Vakzinierung (V4) war der Anstieg nur bei einem Patienten zu sehen (Pat.Nr.20: 48,11 Treg/μl; Pat.Nr.40: 40,76 Treg/μl).

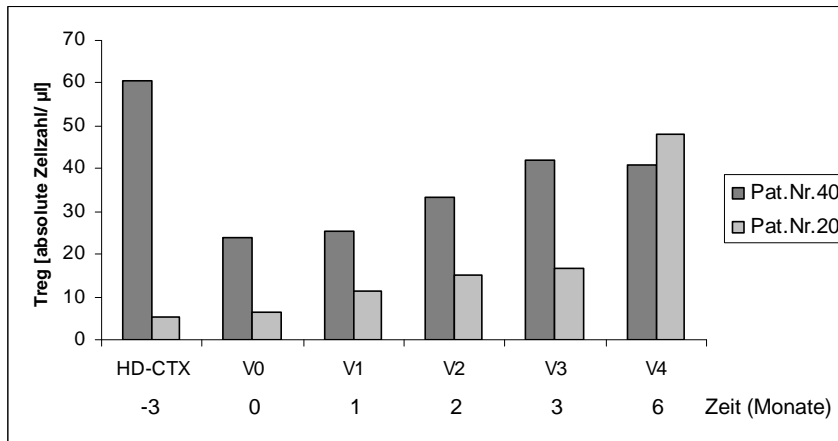


Abbildung 3.15: Verlauf der absoluten Treg-Zahlen zweier MM-Patienten unter Immuntherapie.

Zum Zeitpunkt der HD-CTX war hier nur bei einem Patient ein höherer Wert als zum Zeitpunkt V0 zu sehen. Während der Therapie (V1-3) zeigten aber beide Patienten einen Anstieg der Werte. Nach Abschluß der Therapie (V4) war dieser Anstieg nur bei einem Patienten sichtbar.

Da es sich hier bei beiden Patienten um Einzelwerte handelt konnten keine statistischen Analysen durchgeführt werden.

Diese Analyse zeigte also einen Anstieg der prozentualen und absoluten Treg-Zahlen während einer Immuntherapie bei zwei MM-Patienten. Um die dargestellten Ergebnisse besser analysieren zu können, wurden von beiden Patienten die zu denselben Zeitpunkten gemessenen absoluten CD4⁺- (Abb. 3.16) und CD8⁺-Werte (Abb. 3.17) zusätzlich aufgetragen. Wie auch für die absoluten Treg-Zahlen gemessen zeigte ein Patient zum Zeitpunkt der HD-CTX höhere Werte für CD4⁺-Zellen (Pat.Nr.40: HD-CTX: 453,21 CD4⁺-Zellen/µl; V0: 363,18 CD4⁺-Zellen/µl) im Vergleich zum Zeitpunkt V0, der andere hingegen niedrigere (Pat.Nr.20: HD-CTX: 77,49 CD4⁺-Zellen/µl; V0: 122,63 CD4⁺-Zellen/µl). Im Verlauf der Immuntherapie (V1-3) war aber bei beiden Patienten im Gegensatz zu den für die absolute Zellzahl der Treg gemessenen Werte kein kontinuierlicher Anstieg der CD4⁺-Zellen zu sehen. Beide Patienten zeigten hier einen leicht höheren Wert zum Zeitpunkt V1 im Vergleich zu den Zeitpunkten V2 und V3. Der Vergleich der CD4⁺-Zellen zu diesen beiden Zeitpunkten zeigte keinen Unterschied (Pat.Nr.20: 227,90, 167,52, 164,29 CD4⁺-Zellen/µl; Pat.Nr.40: 348,44, 314,13, 325,63 CD4⁺-Zellen/µl). Zum Zeitpunkt V4 wurde für einen Patienten ein deutlich höherer Wert im Vergleich zu V2 und V3 gemessen, für den anderen war dieser Wert im Vergleich nur leicht erhöht (Pat.Nr.20: 407,95 CD4⁺-Zellen/µl; Pat.Nr.40: 344,74 CD4⁺-Zellen/µl).

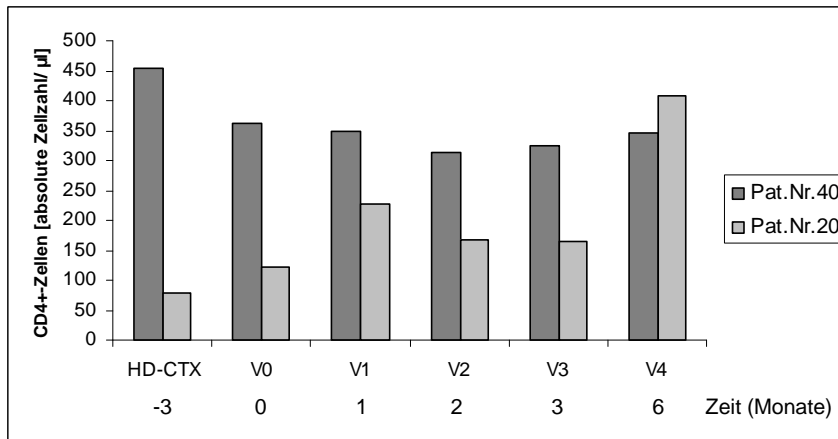


Abbildung 3.16: Verlauf der absoluten CD4⁺-Zahlen zweier MM-Patienten unter Immuntherapie.

Zum Zeitpunkt der HD-CTX zeigte ein Patient einen höheren, der andere einen niedrigeren CD4⁺-Wert im Vergleich zum Zeitpunkt V0. Während der Immuntherapie (V1-3) war bei beiden Patienten ein leicht höherer Wert für V1 im Vergleich zu V2 und V3 zu messen. Zu den Zeitpunkten V2 und V3 blieben die Werte für beide Patienten gleich. Nach Abschluß der Therapie war für beide Patienten ein höherer Wert im Vergleich zu V3 zu sehen. Dies zeigte sich bei Pat.Nr.20 deutlich stärker als bei Pat.Nr.40.

Die Auswertung der CD8⁺-Zellen ergab für beide Patienten einen niedrigeren Wert zum Zeitpunkt der HD-CTX, im Vergleich zum Zeitpunkt V0 (Pat.Nr.40: HD-CTX: 274,23 CD8⁺-Zellen/µl; V0: 1028,74 CD8⁺-Zellen/µl; Pat.Nr.20: HD-CTX: 710,50 CD8⁺-Zellen/µl; V0: 1060,80 CD8⁺-Zellen/µl). Während der Therapie zeigte Pat.Nr.20 eine Erniedrigung der CD8⁺-Zellen vom Zeitpunkt V1 bis V3 (Pat.Nr.20: 1426,92, 1220,38, 579,02 CD8⁺-Zellen/µl). Bei Pat.Nr.40 blieben die Werte für V1 und V2 zunächst gleich. Zum Zeitpunkt V3 wurde auch hier ein niedrigerer Wert als zum Zeitpunkt V1 und V2 gemessen (Pat.Nr.40: 1001,14, 1017,37, 924,43 CD8⁺-Zellen/µl). Nach Abschluß der Therapie wurde für Pat.Nr.20 ein höherer Wert, für Pat.Nr.40 ein niedrigerer Wert als zum Zeitpunkt V3 gemessen (Pat.Nr.20: 805,90 CD8⁺-Zellen/µl; Pat.Nr.40: 682,65 CD8⁺-Zellen/µl).

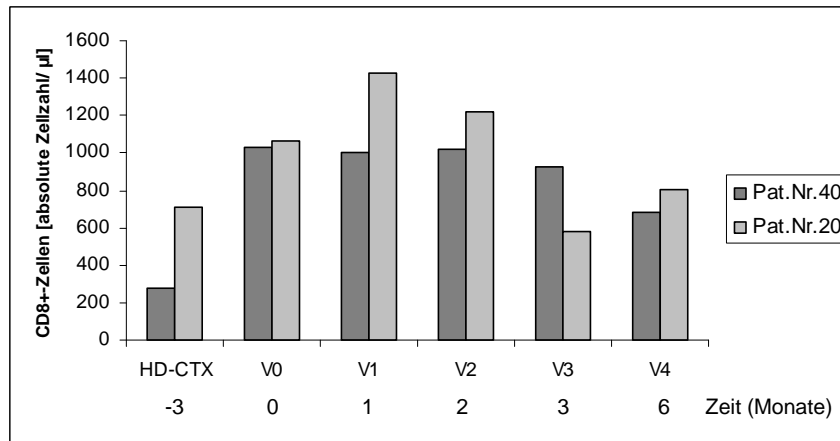


Abbildung 3.17: Verlauf der absoluten CD8⁺-Zahlen zweier MM-Patienten unter Immuntherapie.

Zum Zeitpunkt der HD-CTX zeigten beide Patienten einen niedrigeren CD8⁺-Wert im Vergleich zum Zeitpunkt V0. Während der Immuntherapie (V1-3) war bei Pat.Nr.20 eine Abnahme der Werte von V1 bis V3 zu sehen. Bei Pat.Nr.40 blieben die Werte für V1 und V2 zunächst gleich. Zum Zeitpunkt V3 wurde ein niedrigerer Wert im Vergleich zu V1 und V2 gemessen. Nach Abschluß der Therapie wurde für einen Patienten ein höherer Wert, für den anderen ein niedrigerer Wert im Vergleich zu V3 gemessen.

3.3 Isolierungen von Treg aus peripherem Blut normaler Spender und Buffy Coat-Präparaten

Um die Treg auch funktionell analysieren zu können, sollte ein Verfahren etabliert werden, um diese Zellen möglichst schonend mit einer guten Ausbeute zu isolieren. Hierzu wurden Vollblutproben normaler Spender oder, um eine höhere Ausgangszellzahl einsetzen zu können, Buffy-Coat-Präparate normaler Spender verwendet. Bei einem Buffy-Coat-Präparat handelt es sich um ein Konzentrat, in dem Lymphozyten und Thrombozyten angereichert sind. Buffy-Coats können durch Abzentrifugieren oder über den Einsatz von speziellen Filtern aus Vollblut gewonnen werden.

Isolierung der mononukleären Zellfraktion aus Vollblut bzw. Buffy Coats

Im ersten Schritt wurde aus dem gespendeten Vollblut bzw. dem Buffy Coat die mononukleäre Zellfraktion isoliert. Dies geschah mittels zweier verschiedener Protokolle (der „kurzen“ und der „langen“ Methode; siehe 2.4.2 und 2.4.1).

Um die besser geeignete Methode zu finden, wurde in einem Kontrollversuch der Buffy Coat eines Spenders gut resuspendiert und in zwei Hälften aufgeteilt. Je eine Hälfte wurde mit einer der beiden Methoden bearbeitet. Die isolierte mononukleäre Zellfraktion wurde anschließend am Durchflußzytometer analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass nach der langen Methode (2.4.1) im Vergleich zur kurzen (2.4.2), nur ca. die Hälfte der Lymphozyten isoliert werden konnten (lange Methode: $1,5 \times 10^8$ Lymphozyten; kurze Methode: $2,9 \times 10^8$ Lymphozyten). Um eine für funktionelle Tests hinreichende Treg-Zellzahl zu erlangen, wurde für Isolierungsversuche die kurze Methode verwendet.

Bei der Aufreinigung der mononukleären Zellfraktion zeigte sich zusätzlich ein großer Unterschied zwischen der Verwendung von filtrierten und nicht filtrierten Buffy Coats. Nach der Aufreinigung filtrierter Buffy Coats war oft eine Isolierung von Treg nicht mehr möglich, da die Zellen während der Isolierungsversuche abstarben. Bei unfiltrierten Buffy Coats konnte dieses Phänomen nicht beobachtet werden. Möglicherweise wurden die Zellen durch eine Filtration bereits beschädigt, so dass eine weitere zeitlich aufwendige Aufreinigung zum Absterben der Zellen führte.

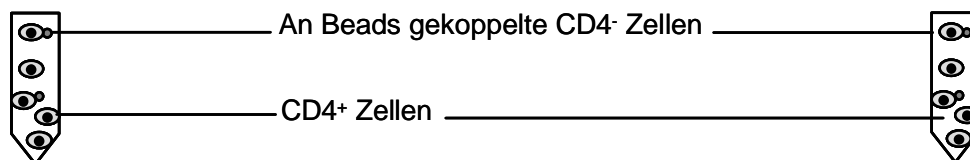
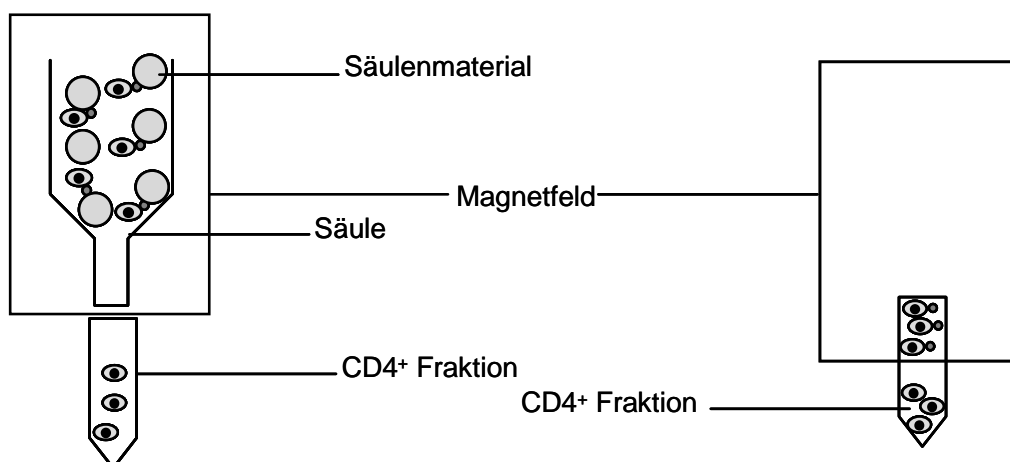
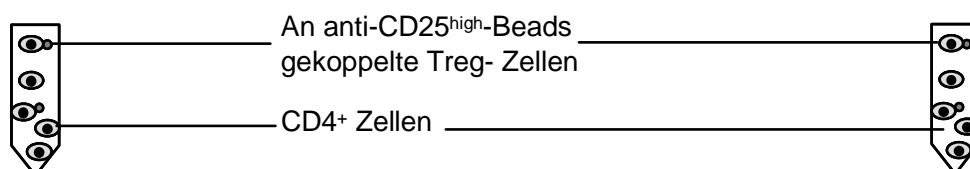
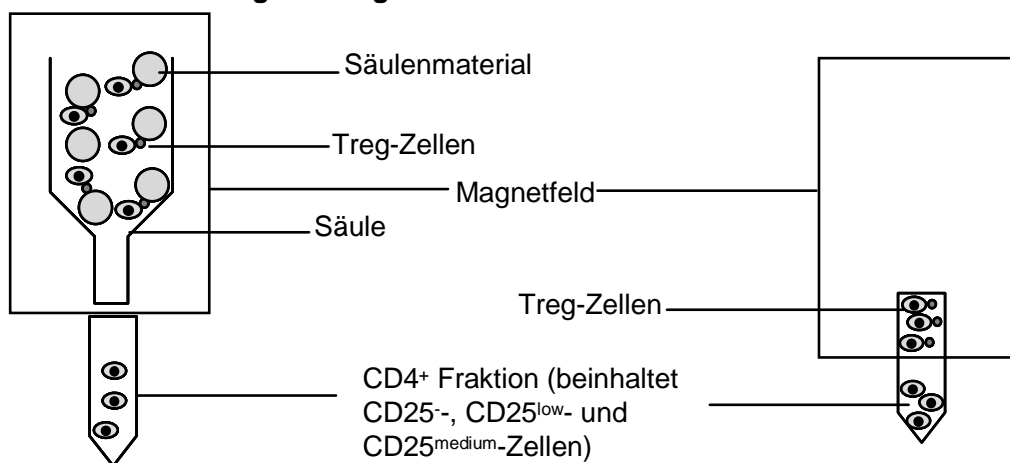
Isolierungen von Treg

Die Treg-Isolierungen erfolgten nach zwei verschiedenen Grundmechanismen: die Isolierungen mittels magnetischer Partikel („magnetischer Beads“; Abbildung 3.18) und die Isolierungen mittels eines präparativen Durchflußzytometers („FACS“; Abbildung 3.21). Nach Abschluß der jeweiligen Isolierung wurden die Ausbeute und die Reinheit der erhaltenen Fraktionen am Durchflußzytometer überprüft.

3.3.1 Vergleich zweier Methoden zur Treg-Isolierung mittels magnetischer Beads.

Zunächst wurden zwei Methoden verglichen, die das Prinzip der Isolierung durch magnetische Beads unterstützen (Abbildung 3.18). Verglichen wurde die Aufreinigung mit Hilfe des „CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit Human“ der Firma Miltenyi und die Aufreinigung mittels des „DynaL CD4⁺CD25⁺ Treg Kit“ der Firma Dynal. Der Unterschied der beiden Methoden liegt zunächst in der Verwendung verschiedener Beads. Während die Firma Miltenyi Microbeads verwendet, die nach der Aufreinigung an die Treg gebunden bleiben, verwendet das Dynal-Verfahren Beads, die im Anschluß an die Aufreinigung von den Zellen entfernt werden müssen. Ein weiterer Unterschied liegt in der Methode der Trennung von markierten und nicht markierten Fraktionen. Während Miltenyi hierfür dicht gepackte Säulen verwendet, an deren Material die Beads innerhalb eines Magnetfeldes binden, verbleibt die Zellsuspension bei Dynal im Röhrchen und wird hier einem Magnetfeld ausgesetzt, so dass die markierten Zellen im Röhrchen gehalten werden, während die nicht markierten Zellen im Überstand abgenommen werden können.

Die Ausbeute wurde bei allen verwendeten Methoden folgendermaßen berechnet: Von der Zellfraktion, aus der die Treg isoliert werden sollten, wurde ein Aliquot entnommen und mit Hilfe des in 2.3.1 beschriebenen durchflußzytometrischen Protokolls CD4-FITC / CD25-PE / CD3-ECD / CD8-PC5 analysiert. Mittels des spezifischen Gates für die Treg-Fraktion konnte die Anzahl der Treg in der jeweiligen Probe bestimmt werden. Die so erhaltenen Daten wurden nach der Aufreinigung mit dem Ergebnis verglichen und die Ausbeute in Prozent von den theoretisch in der Probe enthaltenen Treg angegeben.

Miltenyi**Dynal****1. Schritt: Kopplung der CD4⁺-Fraktion an die magnetischen Beads****2. Schritt: Entfernen der CD4⁺- Fraktion****3. Schritt: Markierung der Treg (CD4⁺CD25^{high})****4. Schritt: Isolierung der Treg**

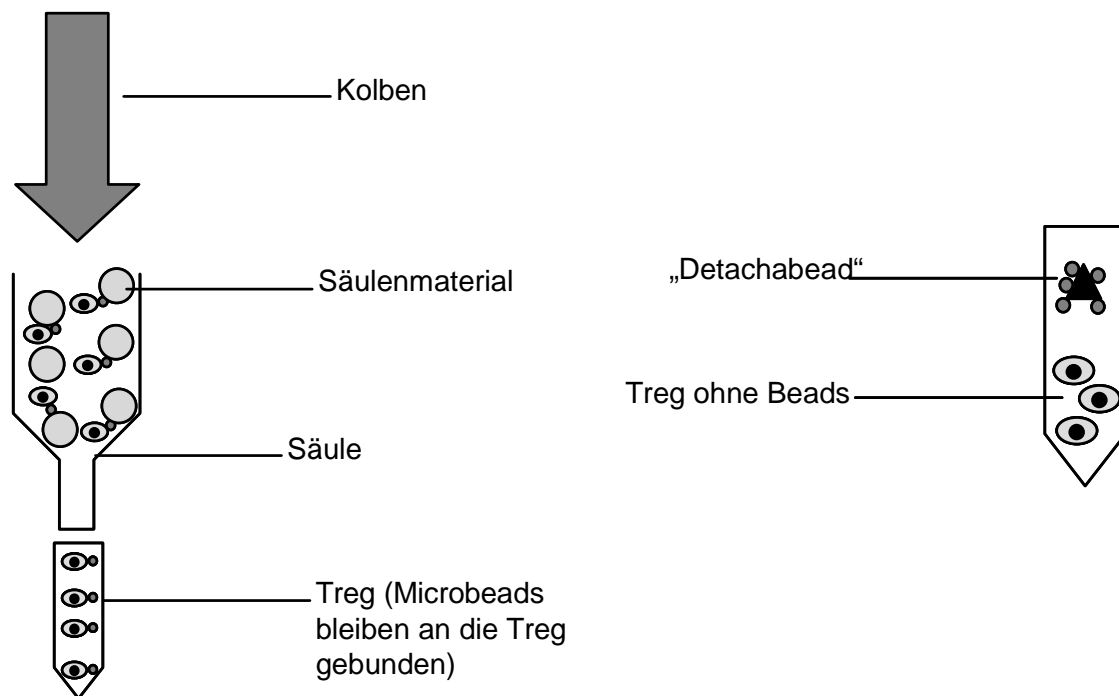
Miltenyi**Dynal****5. Schritt: Beads entfernen bzw. sammeln der Treg**

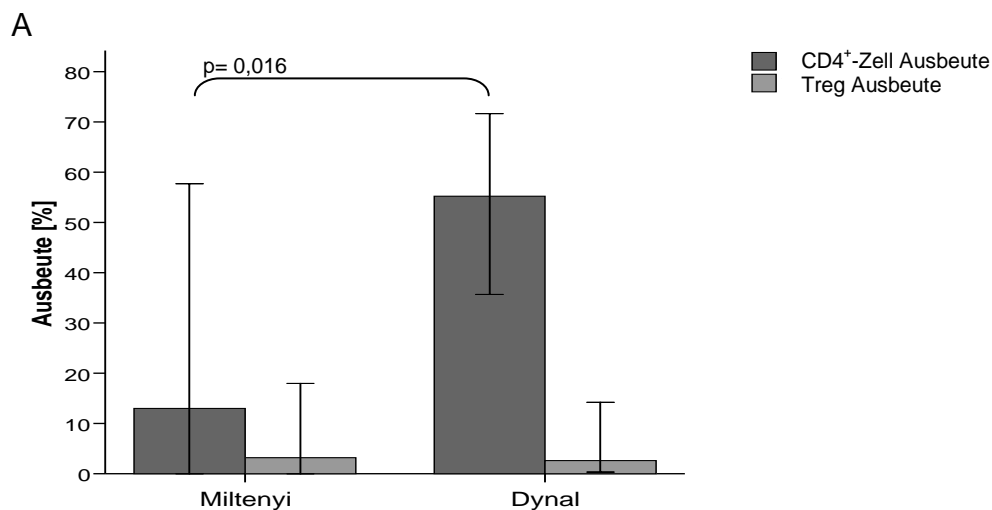
Abbildung 3.18: Schematische Darstellung der Treg-Isolierung nach Miltenyi im Vergleich zu Dynal.

Beide gezeigten Methoden verwenden magnetische Beads und Magnetfelder um Treg-Zellen aus einer mononukleären Zellfraktion zu isolieren. Die Unterschiede bestehen in der Verwendung verschiedener Beads und der Verwendung von Säulen bei der Methode der Firma Miltenyi im Vergleich zu Röhrchen, die einem Magnetfeld ausgesetzt werden bei der Methode der Firma Dynal.

In Abbildung 3.19 ist die erreichte Ausbeute der CD4⁺-Zellen und der Treg-Zellen gezeigt. Die Ausbeute der CD4⁺-Zellen war bei der Verwendung des von Dynal hergestellten Kits signifikant höher ($p=0,016$) als bei dem von Miltenyi (Dynal: im Median 55,25% (35,71-71,67); Miltenyi: im Median 13,02% (0-57,69); 3.19A). Die Reinheit dieser Fraktion war bei dem Miltenyi-Verfahren signifikant höher ($p=0,045$) als bei Dynal (Dynal: im Median 86,95% (79,1-95,9); Miltenyi: im Median 95,05% (85-98,5); 3.19 B). Beim ersten Schritt der Aufreinigung wurde also mit Hilfe des Kits der Firma Dynal eher eine gute Ausbeute erzielt, bei der Verwendung des Kits der Firma Miltenyi hingegen eher eine gute Reinheit. Im zweiten Schritt der Aufreinigung wurden die Treg-Zellen aus der CD4⁺-Fraktion isoliert. Bei der Verwendung beider Kits konnte eine gleichwertige Ausbeute ($p=0,9$) an Treg erzielt werden (Miltenyi: im

Median 3,19% (0-18); Dynal: im Median 2,66% (0,34-14,2)). Diese lag bei der Anwendung beider Kits im Median unter 5% der theoretisch in der Probe vorhandenen Treg. Die Reinheit der so erlangten Treg war bei Dynal mit im Median 83,3% (49,3-97,4) signifikant höher ($p=0,028$) als bei Miltenyi (im Median 43,4% (22-87)).

Durch die höhere Reinheit der Treg bei Dynal scheint diese Methode im Vergleich die besser geeignete zu sein. Mit beiden Methoden konnte aber nur eine Treg-Ausbeute unter im Median 5% erlangt werden. Da eine Methode zur Treg-Isolierung etabliert werden sollte, mit deren Hilfe auch eine Isolierung aus MM-Patientenblutproben möglich sein sollte, erwies sich diese Ausbeute als zu niedrig. Auch für einen anschließenden Suppressionstest ohne vorherige Expansion der Treg, um jegliche Manipulation vor dem funktionellen Test zu vermeiden, erschien eine solche Ausbeute zu gering. Im nächsten Schritt sollten deshalb zwei weitere Methoden der Isolierung, basierend auf einem präparativen Durchflußzytometer (FACS) verglichen und etabliert werden.



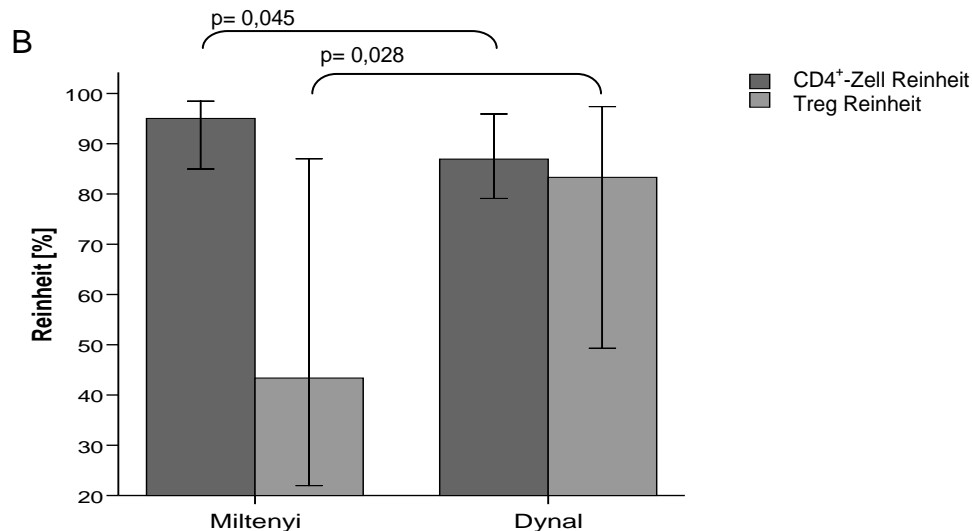


Abbildung 3.19: Ausbeute und Reinheit der CD4⁺- und Treg-Fraktion beim Vergleich der Aufreinigung mit den Firmen Miltenyi und Dynal (Methode: Magnetische Beads)

A: Ausbeuten der CD4⁺- und Treg-Zellen. Mit dem Kit der Firma Dynal konnte eine signifikant höhere Ausbeute im Bezug auf die CD4⁺-Zellen erreicht werden. Die Ausbeuten der Treg-Zellen waren allerdings nicht signifikant unterschiedlich.

Fallzahlen: Miltenyi: CD4⁺-Ausbeute: n=11; Treg-Ausbeute: n=8

Fallzahlen: Dynal: CD4⁺-Ausbeute: n=6; Treg-Ausbeute: n=6

B: Reinheiten der isolierten Zellfraktionen. Die Reinheit der im ersten Schritt isolierten CD4⁺-Zellen war bei Miltenyi signifikant höher als bei Dynal. Die Reinheit der Treg-Zellen war allerdings bei Dynal signifikant höher

Fallzahlen: Miltenyi: CD4⁺-Reinheit: n=10; Treg-Reinheit: n=8

Fallzahlen: Dynal: CD4⁺-Reinheit: n=6; Treg-Reinheit: n=6

3.3.2 Treg-Isolierungen mittels FACS

Aufgrund der schlechten Ausbeuten bei den auf magnetischen Beads basierenden Isolierungsmethoden wurden Isolierungen mittels eines FACS durchgeführt. Verglichen wurden Versuche, bei denen die CD4⁺-Fraktion mit Hilfe des Kits der Firma Miltenyi vorisoliert wurde und die Treg Isolierung aus dieser Fraktion mittels des FACS stattfand und solche, bei denen die Isolierung ausschließlich durch das FACS erfolgte. Abbildung 3.21 zeigt eine schematische Darstellung dieser Methoden. Die Einstellung der Gates am FACS erfolgte anhand der zuvor durchgeführten Treg-Messung mittels des Protokolls CD4-FITC / CD25-PE / CD3-ECD / CD8-PC5 (siehe 2.3.1). Der hier erhaltene Treg Prozentsatz an der CD4⁺-Fraktion wurde als Grundlage für die Gateeinstellung verwendet. Das Gate zum Sortieren wurde so gewählt, dass die sortierte Prozentzahl die zuvor gemessene nicht überschritt, um eine Kontaminationen mit CD25^{low}-oder CD25^{medium}-Zellen möglichst zu vermeiden (Abb.3.20). In P3 wurden die Ereignisse gezeigt, bei denen es sich per Definition um die Treg-Zellen handeln sollte. Gate P2 zeigt CD4⁺CD25⁻-Zellen, die in späteren

funktionellen Tests als Zielzellen verwendet wurden und somit ebenfalls isoliert wurden. Die in Gate P4 zu sehenden $CD4^-$ -Zellen sowie die zwischen Gate P2 und P3 gezeigten $CD4^+CD25^{low}$ - bzw. $CD4^+CD25^{medium}$ -Zellen wurden verworfen.

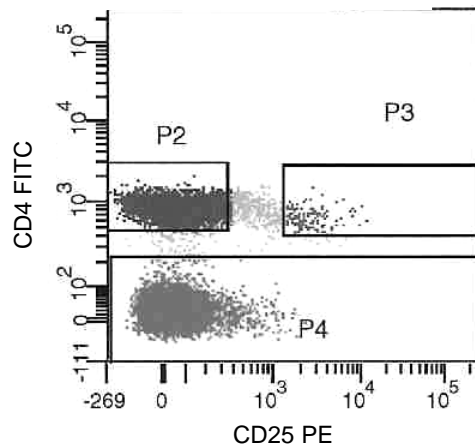


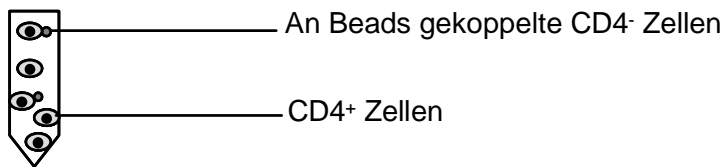
Abbildung 3.20: Isolierung von Treg mittels FACS.

Gate P3 zeigt die Treg. Gate P2 zeigt die für funktionelle Tests verwendeten Zielzellen ($CD4^+ CD25^-$). Die in Gate P4 gezeigte Zellfraktion ($CD4^-$ -Zellen) sowie die $CD4^+CD25^{low}$ - bzw. $CD4^+CD25^{medium}$ -Zellen (zwischen Gate P2 und P3) wurde verworfen.

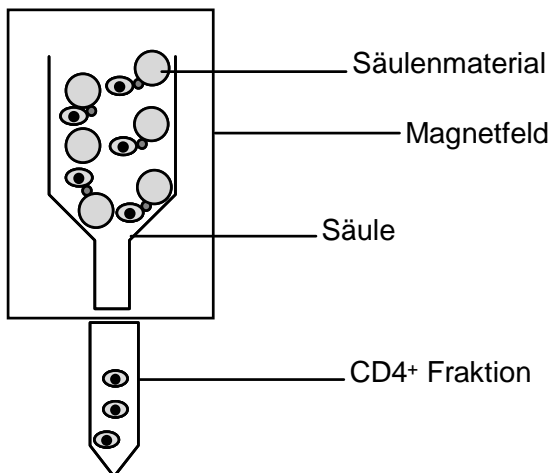
FACS mit Voraufreinigung (Miltenyi)

FACS allein

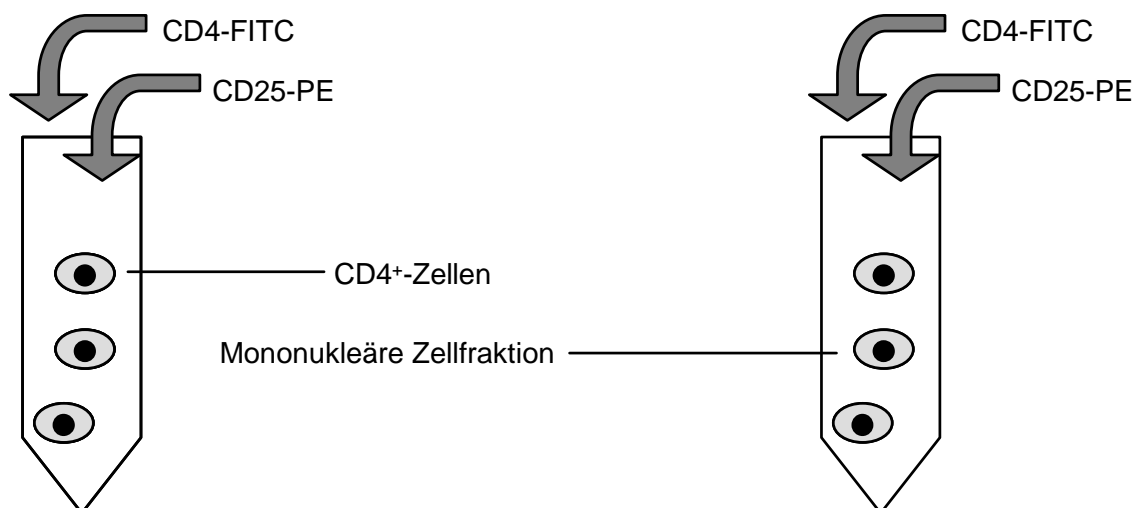
1. Schritt: Kopplung der CD4⁺ Fraktion an die magnetischen Beads

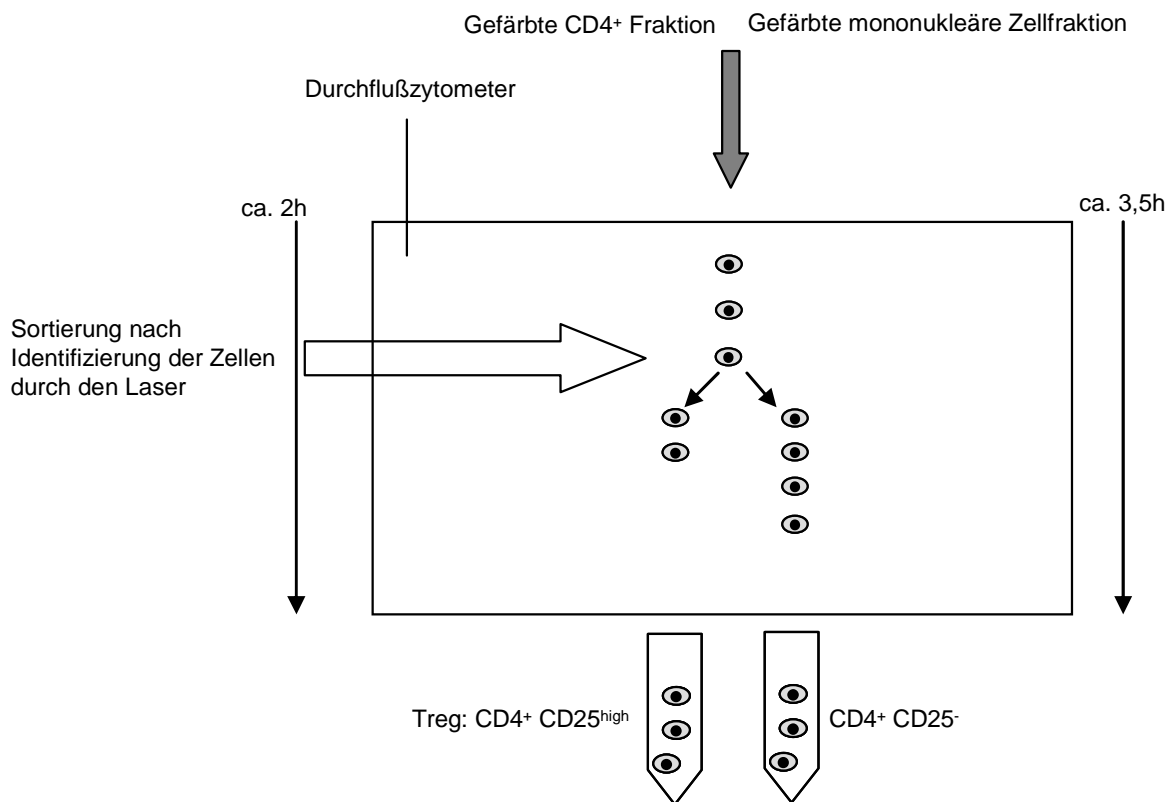


2. Schritt: Entfernen der CD4⁺ Fraktion



3. Schritt: Färbung der Zellen mit anti CD4 und CD25 Antikörpern



FACS mit Voraufreinigung (Miltenyi)**FACS allein****4. Schritt: Isolierung der Treg mittels eines präparativen Durchflußzytometers****Abbildung 3.21: Schematische Darstellung der Treg-Isolierung mittels FACS.**

Bei der kombinierten Methode wurde die Aufreinigung der CD4⁺-Zellen mit Hilfe magnetischer Beads durchgeführt. Der zweite Teil der Aufreinigung fand am FACS statt. Durch die Voraufreinigung verkürzte sich dabei die Zeit am FACS. Wurde hingegen ausschließlich das Durchflußzytometer verwendet, verlängerte sich die Zeit der Aufreinigung an diesem Gerät.

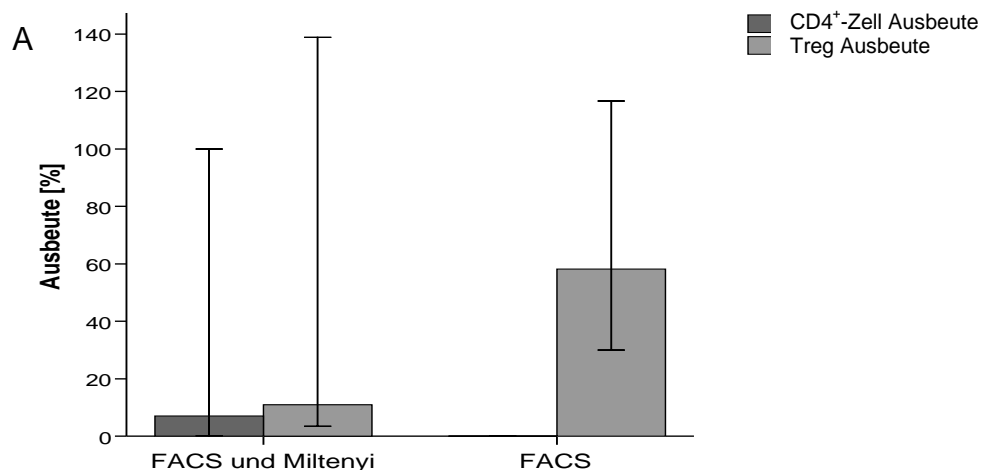
Abbildung 3.22 A zeigt den Unterschied zwischen den Ausbeuten der FACS-Isolierungen. Die CD4⁺-Aufreinigung entfiel bei der Methode, die ausschließlich das FACS verwendet. Der Vergleich der Treg Ausbeute ergab bei diesen Methoden (FACS mit Voraufreinigung: im Median 10,91% (3,51-100); FACS allein: im Median 58,15% (12,4-100)) keine signifikanten Unterschiede ($p=0,382$). Ein Grund hierfür scheinen die sehr stark schwankenden Ergebnisse bei der kombinierten Methode zu sein. Tendenziell erschien aber die Verwendung des FACS ohne vorherige Aufreinigung der CD4⁺-Fraktion die zuverlässigere und damit besser geeignete Methode zu sein. Im Vergleich zu den Methoden unter Verwendung von magnetischen Beads zeigte sich hier eine deutlich höhere Ausbeute von im Median 58,15% der in der mononukleären Zellfraktion theoretisch vorhandenen Treg im Gegensatz zu unter 5%. Abbildung 3.22 B zeigt die Reinheiten der isolierten

Zellfraktionen. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,881$) im Bezug auf die Reinheit der isolierten Treg-Fraktionen (FACS mit Voraufreinigung: im Median 73,9% (47,7-87,2); FACS allein: im Median 72,3% (64,4-85,4)). Eine niedrigere Varianz ist aber auch hier bei der Methode, die nur das FACS verwendet zu sehen.

Beim Vergleich der verwendeten Isolierungsmethoden für Treg-Zellen fiel zunächst eine zu geringe Ausbeute von unter 5% bei Verwendung von ausschließlich auf magnetischen Beads basierenden Methoden auf. Verwendete man zur Aufreinigung der Treg ein FACS, so konnten Ausbeuten von im Median 58,15% der theoretisch in der mononukleären Zellfraktion vorhandenen Treg erzielt werden.

Ein zweiter wichtiger Punkt bei der Aufreinigung von Treg war die Reinheit der isolierten Fraktion. Hierbei konnte mit der Dynal-Methode ein Wert von im Median 83,3% erzielt werden. Bei einem Vergleich mit der Reinheit der Treg-Fraktion die mit dem FACS allein isoliert wurde (im Median 72,3%) konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden ($p=0,273$).

Zusammengefasst wurde also das beste Ergebnis durch die ausschließliche Verwendung des FACS erzielt.



B

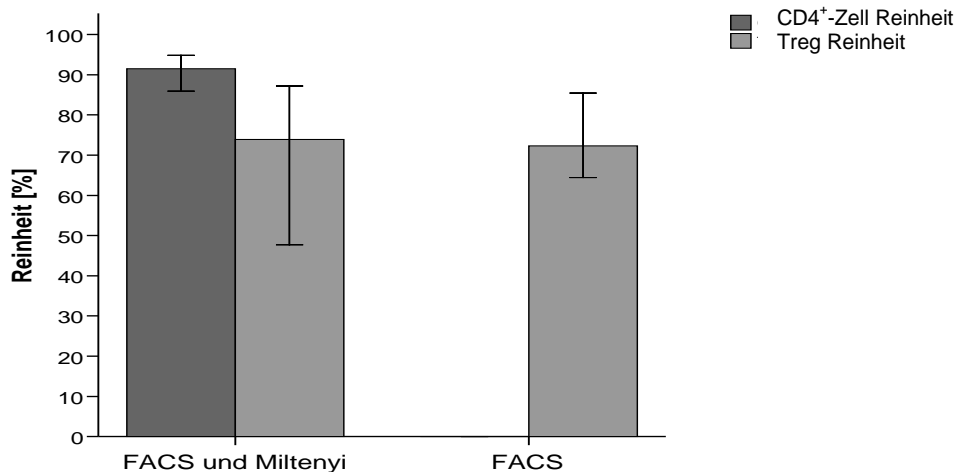


Abbildung 3.22: Ausbeute und Reinheit der CD4⁺- und Treg-Fraktion beim Vergleich der Aufreinigungsmethoden mittels FACS.

A: Ausbeuten für die CD4⁺- bzw. die Treg-Zellfraktion. Im Vergleich ergab sich kein signifikanter Unterschied. Die kombinierte Methode zeigte aber eine sehr starke Varianz und schien somit unzuverlässiger zu sein.

Fallzahlen: Ausbeute CD4⁺-Zellen: FACS und Miltenyi: n=3;

Ausbeute der Treg-Zellen: FACS und Miltenyi: n=3; FACS allein: n=13

B: Reinheiten der Zellfraktionen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der beiden Methoden festgestellt werden. Auch hier schien die FACS-Methode ohne Voraufreinigung ein zuverlässigeres Ergebnis zu zeigen.

Fallzahlen: Reinheit CD4⁺-Zellen: FACS und Miltenyi: n=3;

Reinheit der Treg-Zellen: FACS und Miltenyi: n=3; FACS allein: n=5

3.4 *In-vitro*-Expansion isolierter Treg

Da Treg-Zellen nur 2-5% der CD4⁺-Fraktion ausmachen, ist es schwer, aus kleinen Mengen Blut eine genügende Zellzahl für funktionelle Tests zu isolieren. Besonders, da mit Hilfe der hier etablierten Methoden in späteren Versuchen Treg aus Patientenblut isoliert werden sollten, das nur begrenzt zur Verfügung stand.

Eine Möglichkeit, dieses Problem zu lösen, ist die *In-vitro*-Expansion der Treg nach erfolgreicher Isolierung. In der Literatur beschriebene Daten zeigen, dass auch *In-vitro* expandierte Treg-Zellen ihre Funktionalität beibehalten (Kreijveld et al. 2006). Deshalb sollten in dieser Arbeit zwei Methoden zur Expansion dieser Zellen getestet bzw. etabliert werden. Die Expansion sollte hierbei durch Antigen-unspezifische Stimulation mit CD3- und CD28-spezifischen Antikörpern erfolgen.

Expansion von Treg mittels Beschichtung einer Mikrotiterplatte

In sechs Versuchen wurde ein Verfahren getestet, bei dem eine Mikrotiterplatte mit CD3-spezifischen Antikörpern (0,5-5µg/ml) beschichtet wurde. Zusätzlich wurden

lösliche CD28-spezifische Antikörper (2µg/ml) und verschiedene IL-2-Konzentrationen (50-300U/ml) zugegeben. In allen sechs Versuchen konnte kein Zellwachstum nachgewiesen werden. Nach einer Zeitspanne von 7-30 Tagen wurden die Versuche aufgrund des Absterbens der Zellen abgebrochen.

Expansion von Treg mittels des Dynabeads Human Treg Expander-Kits

Für eine andere Methode zur Expansion von Treg wurde das Dynabeads Human Treg Expander-Kit der Firma Dynal getestet. Hierbei wurden magnetische Beads verwendet, an die CD3- und CD28-spezifische Antikörper gekoppelt waren. Zusätzlich wurde eine hohe IL-2 Konzentration von 500U/ml eingesetzt, um die prinzipielle Anergie der Treg zu brechen. In Abbildung 3.23 sind Photos des Expansionsansatzes von Tag 1-8 nach Zugabe der Beads gezeigt. Abbildung 3.23 A zeigt die Treg-Zellen an Tag 1. Zu sehen ist eine Ansammlung der Zellen und Beads in Aggregaten. Auch eine leichte Aktivierung der Zellen, zu sehen an der veränderten Morphologie (die Zellen waren größer und nicht mehr gleichmäßig rund), ist sichtbar. An Tag 5 der Expansion (Abb.3.23 B) waren die Aggregate deutlich angewachsen und die Morphologie der Zellen ließ eine weitere Aktivierung vermuten. Im Vergleich zu Abbildung 3.23 A sind mehr Zellen zu sehen. Abbildung 3.23 C zeigt ein Photo des Expansionsansatzes an Tag 8. Die Zellen wurden nach Tag 5 resuspendiert und in eine Platte mit 24 Vertiefungen überführt. Zu sehen ist die Neubildung der aus Beads und wahrscheinlich aktivierten Zellen bestehenden Aggregate.

Die in Abbildung 3.24 A-C dargestellten Photos zeigen den Expansionsansatz der aus derselben Isolierung stammenden CD4⁺CD25⁻-Zellen. Nach Trennung der verschiedenen Fraktionen erfolgte parallel zur Treg-Expansion auch eine Expansion der CD4⁺CD25⁻-Fraktion. Beim Vergleich der Abbildungen 3.23 (Expansionskultur der Treg) und 3.24 (Expansionskultur der CD4⁺CD25⁻-Zellen) fällt eine deutlich stärkere Vermehrung der CD4⁺CD25⁻-Fraktion unter gleichen Bedingungen auf.

Nach Abschluß der Expansion konnte eine Entfernung der Beads mittels vorsichtiger Resuspension und anschließender Anwendung eines magnetischen Feldes durchgeführt werden.

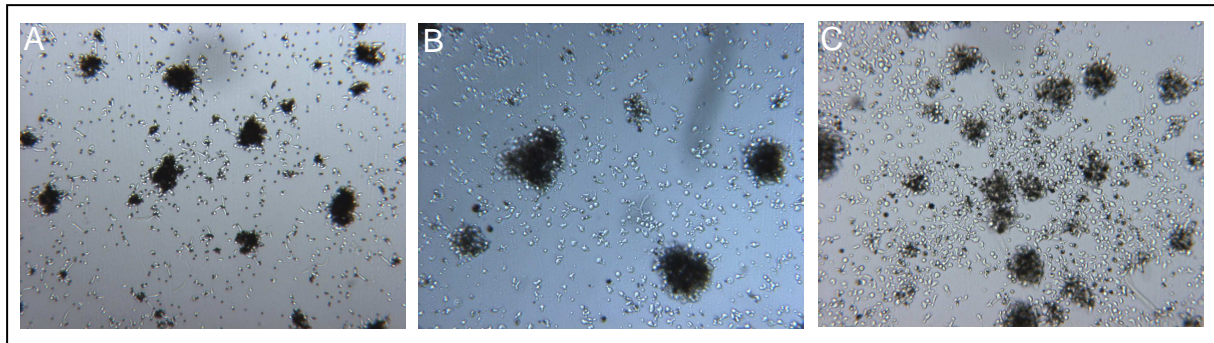


Abbildung 3.23: Expansion von Treg-Zellen mittels des Dynabeads human Treg-Expander-Kits der Firma Dynal (Tag1-8 nach Zugabe der Beads).

A: Treg-Expansionskultur an Tag 1 nach Zugabe der Beads. Eine Aggregatbildung und Morphologieveränderung der Treg-Zellen ist erkennbar. B: Expansionskultur an Tag 5. Eine stärkere Morphologieveränderung (möglicherweise durch eine Zellaktivierung) und größere Aggregate sind zu erkennen. C: Tag 8 des Experimentes. Nach Resuspendierung und Überführung der Zellen von einer Mikrotiterplatte in eine Platte mit 24 Vertiefungen ist eine Neubildung der Aggregate und eine Vermehrung der Zellen von Tag 1 bis Tag 8 zu erkennen. Vergrößerung: 100x

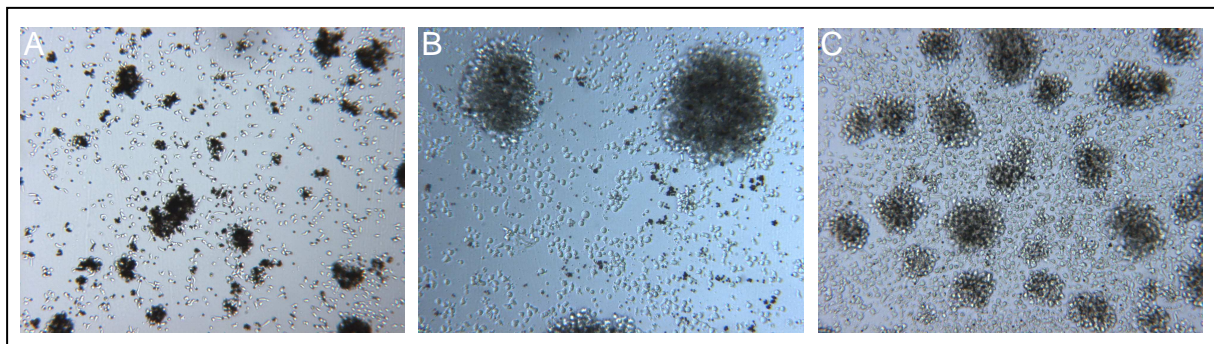


Abbildung 3.24: Expansionskultur von CD4⁺CD25⁻-Zellen mittels des Dynabeads human Treg-Expander-Kits der Firma Dynal (Tag1-8 nach Zugabe der Beads).

A-C: Expansionskultur von CD4⁺CD25⁻-Zellen. Die Zellen stammen aus derselben Isolierung wie die in Abbildung 18 gezeigten Treg. Die Photos wurden ebenfalls an den Tagen 1, 5 und 8 aufgenommen. Im Vergleich mit Abbildung 18 (Treg-Zellen) ist an den Tagen 5 und 8 eine deutlich stärkere Vermehrung der Zellen zu sehen. Der Unterschied in der Stimulierbarkeit von Treg und CD4⁺CD25⁻-Zellen ist deutlich zu sehen. Vergrößerung: 100x

Um den Unterschied zwischen der Expansion von Treg-Zellen und der der CD4⁺CD25⁻-Zellen deutlich zu machen, wurde vor der Zugabe der Expander-Beads und nach Abschluß der Expansion die Zellzahl bestimmt. Aus diesen Angaben wurde anschließend der Faktor bestimmt, um den die Zellzahlen gewachsen waren. Abbildung 3.25 zeigt die graphische Darstellung dieser Auswertung. Die isolierten Treg-Zellen vermehrten sich demnach signifikant langsamer ($p=0,017$) als die isolierten CD4⁺CD25⁻-Zellen (Treg: im Median Faktor 10 (1,67-24,09); CD25⁻-Zellen: im Median Faktor 23,3 (8,67-275)).

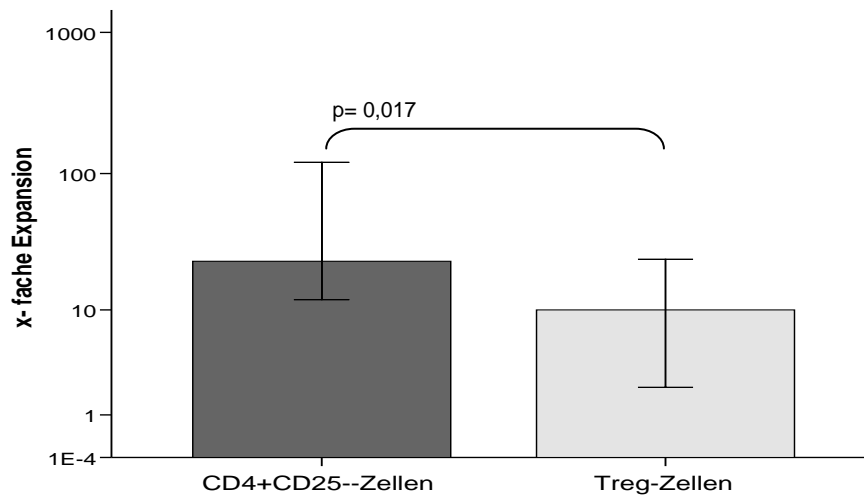


Abbildung 3.25: Expansion von Treg im Vergleich zu CD4⁺CD25⁻-Zellen.

Vergleicht man den Faktor um den die Treg-Zellzahlen und die Zellzahlen der CD4⁺CD25⁻-Zellen unter Zugabe von Expander Beads und 500U/μl IL-2 zugenommen haben, so zeigt sich ein signifikant höheres Wachstum der CD4⁺CD25⁻-Zellen bei gleicher Behandlung.

Fallzahlen: CD4⁺CD25⁻-Zellen: n=10; Treg-Zellen: n=10

Zusätzlich zur Bestimmung der X-fachen Expansion von Treg und CD4⁺CD25⁻-Zellen wurde in fünf Versuchen eine Färbung mit den Oberflächenmarkern CD4 und CD25 sowie eine intrazelluläre Färbung mit einem gegen FOXP3 gerichteten Antikörper durchgeführt, um die Treg nach der Expansion auf ihre Positivität für FOXP3 hin zu überprüfen. FOXP3 wird in der Literatur oft als der bislang beste spezifische Marker für Treg beschrieben, da ihm eine Rolle in ihrer Entwicklung zugesprochen wird (Fontenot et al. 2005a; Ziegler 2007; Haruhiko 2004). Da eine Färbung mit FOXP3 bislang nur intrazellulär möglich ist, ist sie für eine Isolierung nicht geeignet. Für diese Färbungen wurden ausschließlich Zellen aus der FACS-Isolierung verwendet. Zunächst wurden die CD4 und FOXP3 doppelt positiven Zellen in einem Fenster dargestellt (Abb. 3.26 A und C). Eine zweite Darstellung zeigt die Lage der CD4- und FOXP3- doppelt positiven Zellen in einer Graphik, in der CD4- und CD25- doppelt positive Zellen dargestellt sind (Abb. 3.26 B und D).

Abbildung 3.26 zeigt exemplarisch die Ergebnisse einer von fünf durchgeführten FOXP3-Färbungen. Die expandierten CD4⁺CD25⁻-Zellen sind zu 2% positiv für FOXP3. Die expandierte sogenannte Treg-Fraktion weist 9,5% FOXP3-positive Zellen auf. Somit beinhaltete die Treg Fraktion nur 7,5% mehr FOXP3 positive Zellen als die CD4⁺CD25⁻-Fraktion. Die CD4 und FOXP3 doppelt positiven Zellen waren in beiden Fällen auch CD25^{high} positiv (Abb. 3.26 B und D). Auffällig ist auch eine starke Expansion von CD4-negativen und CD4-positiven FOXP3-negativen Zellen in der

Treg-Fraktion. Möglicherweise haben die nach der Isolierung in der Treg-Fraktion verbliebenen CD4-negativen Zellen die Treg überwachsen.

Um Treg erfolgreich zu expandieren ist also eine sehr hohe Reinheit der Treg-Fraktion nach der Isolierung nötig, um eine unerwünschte Expansion von CD4-negativen und CD4-positiven FOXP3-negativen Zellen zu verhindern. Die hier angewandte Methode zur Isolierung der Treg (FACS allein) ergab eine zu geringe Reinheit von im Median 72,3% (siehe Kapitel 3.3.2).

Im nächsten Schritt wurden die expandierten Zellen funktionell getestet und ihre Funktionalität mit nicht expandierten Treg verglichen.

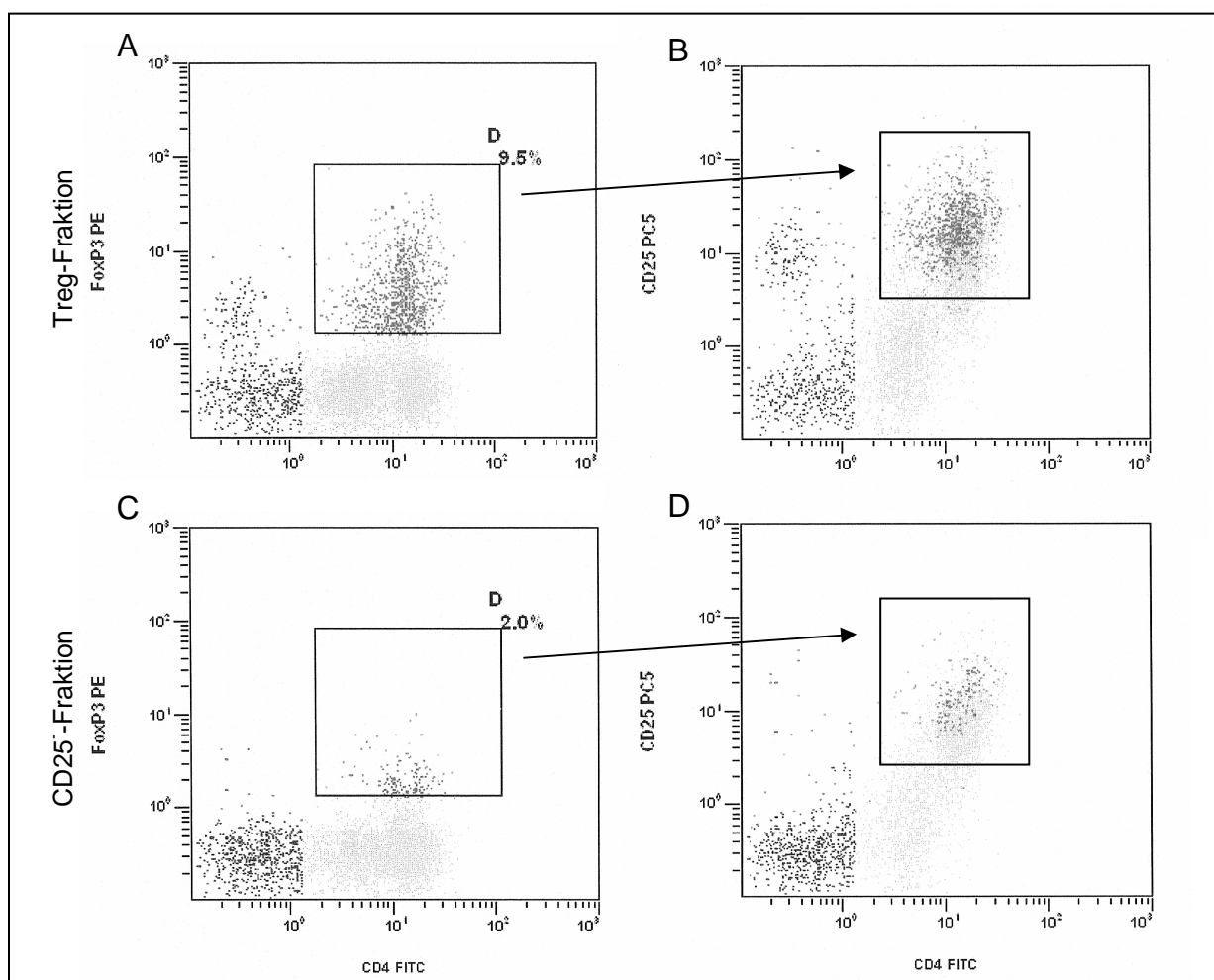


Abbildung 3.26: FOXP3-Färbung von Treg und CD4⁺CD25⁻-Zellen.

A, B: Färbung der Treg-Fraktion mit CD4, CD25 und FOXP3. C, D: Färbung der CD4⁺CD25⁻-Fraktion mit CD4, CD25 und FOXP3. Die Treg Fraktion war zu 9,5% FOXP3 positiv, die CD4⁺CD25⁻-Fraktion zu 2%. Auffällig ist außerdem die starke Kontamination beider Fraktionen mit CD4-negativen Zellen.

3.5 Funktionelle Tests der aus Spenderblut oder Buffy Coat-Präparaten isolierten Treg-Zellen

In dieser Arbeit wurden Treg-Zellen sowohl aus Spenderblut als auch aus Buffy Coat-Präparaten isoliert. Hierbei waren die erhaltenen Proben-Volumina sehr unterschiedlich. Bei der Isolierung von Treg-Zellen aus Buffy Coat-Präparaten standen deutlich mehr Zellen als Ausgangsmaterial zur Verfügung, so dass auch die Ausbeuten entsprechend höher waren. Die aus Spenderblut isolierten Treg-Zellen reichten für einen funktionellen Test nicht aus und mussten somit zunächst expandiert werden. Bei einer Isolierung aus Buffy Coat-Präparaten hingegen konnten meist genügend Zellen isoliert werden, um direkt einen funktionellen Test anzusetzen.

In den funktionellen Tests sollte überprüft werden, ob die isolierten sogenannten Treg eine suppressive Wirkung auf stimulierte $CD4^+CD25^-$ -Zellen haben und ob ein diesbezüglicher Unterschied zwischen expandierten und nicht-expandierten Treg zu sehen ist. Hierzu wurden die Treg in verschiedenen Verhältnissen mit den $CD4^+CD25^-$ -Zellen desselben Spenders kultiviert. Expandierte Zellen gingen erst nach 3-7 Tagen Kultur ohne Stimulus in den Test ein, um sicher zu stellen, dass hier keine Aktivierung mehr vorlag. Stimuliert wurde unspezifisch mit anti-CD3 und anti-CD28-Antikörpern, jedoch ohne Zugabe von IL-2. Die Messung der Proliferation erfolgte mittels Tritium-Thymidin-Einbau von Tag 4 auf Tag 5 der Kultivierung.

Abbildung 3.27 zeigt eine Kokultur zuvor expandierter Zellen an Tag 3 nach Ansetzen. Das Mischungsverhältnis Treg:CD25⁻ 1:1 ist in Abbildung 3.27 A zu sehen, Abbildung 3.27 B zeigt das Mischungsverhältnis Treg:CD25⁻ 0:2. In Abbildung 3.27 B sind bei gleichen Kulturbedingungen und gleicher Gesamtzellzahl deutlich größere Cluster zu sehen, was auf ein stärkeres Wachstum der Zellen in diesem Ansatz hindeutet.

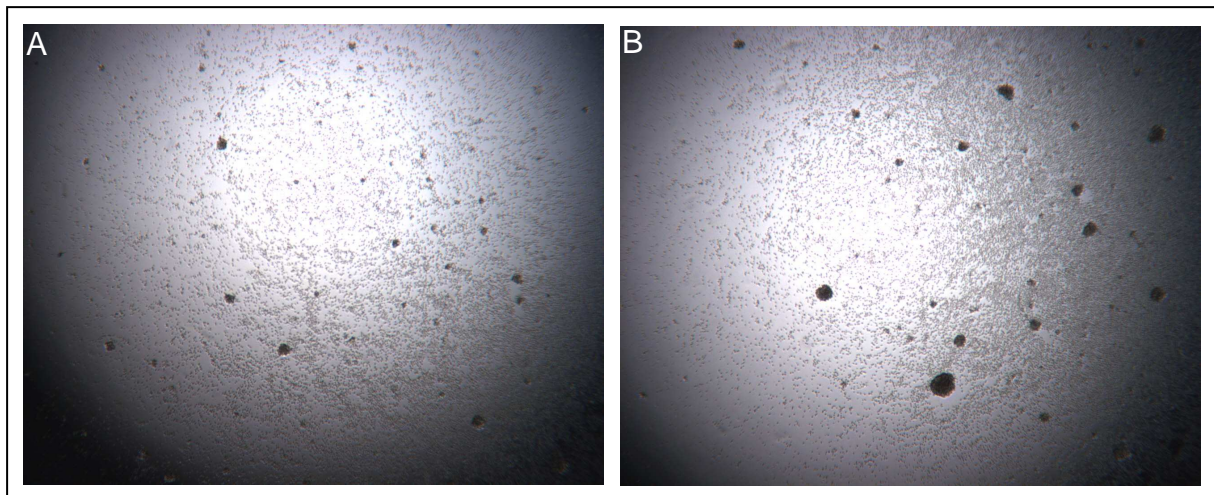


Abbildung 3.27: Kokulturen Treg:CD25⁻ 1:1 und Treg:CD25⁻ 0:2 an Tag 3 der Kultur (expandierte Zellen aus einer Vollblutspende).

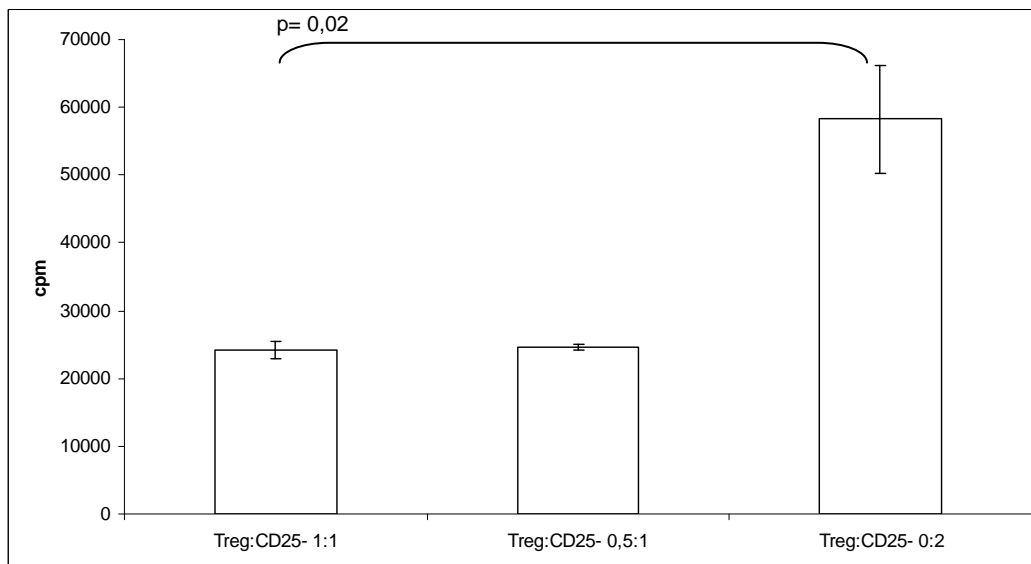
A: Mischungsverhältnis Treg:CD25⁻ 1:1, B: Mischungsverhältnis Treg:CD25⁻ 0:2. Zu sehen ist eine stärkere Clusterbildung in Abbildung B, was auf ein höheres Zellwachstum in dem Ansatz ohne Treg-Zellen hindeuten könnte. Vergrößerung: 40x

Tabelle 3.2 zeigt die Ergebnisse der funktionellen Tests mit zuvor expandierten Treg- und CD4⁺CD25⁻-Zellen. Aufgrund der starken Abweichungen des Tritium-Tyminidin Einbaus zwischen den einzelnen Versuchen (Spendern) wurde hier eine tabellarische Darstellung aller Versuche, sowie eine graphische Darstellung eines Einzelversuches (Abb. 3.28) gewählt. Die Darstellung des Einzelversuches zeigt hierbei Mittelwerte und Standardabweichungen der Triplika. Signifikanzberechnungen erfolgten mittels des Student'schen T-Tests (Programm: Microsoft Excel 2003). In vier von fünf Tests ist ein deutlich stärkeres Wachstum der Zellen im Mischungsverhältnis Treg:CD25⁻ 0:2 (z.B. Spender 1002.2: 20970,67cpm) gegenüber dem Mischungsverhältnis Treg:CD25⁻ 1:1 (z.B. Spender 1002.2: 9028,67cpm) zu sehen. Auf Grundlage der Triplika des in Abbildung 26 dargestellten Einzelversuches konnte für diesen Vergleich ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Student'scher T-Test: $p=0,02$). Bei gleicher Gesamtzellzahl wies also der Ansatz ohne Treg ein höheres Wachstum auf. Möglicherweise könnte dies ein Hinweis auf eine Suppression der CD4⁺CD25⁻-Fraktion durch die Treg-Fraktion sein. Der Vergleich der Ansätze Treg:CD25⁻ 1:1 und Treg:CD25⁻ 0,5:1 zeigte hingegen keinen Unterschied ($p=0,694$). Eine suppressive Wirkung konnte also bei Verwendung von expandierten Treg- und CD4⁺ CD25⁻-Zellen nur bedingt beobachtet werden.

Tabelle 3.2: Suppressionstest mit expandierten Treg und CD4⁺CD25⁻-Zellen.

Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Triplika. Eine Tendenz zu erhöhtem Zellwachstum des Ansatzes ohne Treg im Vergleich zu dem Ansatz mit Treg-Zellen bei gleicher Gesamtzellzahl ist beim Vergleich der Ansätze Treg:CD25⁻ 1:1 und Treg:CD25⁻ 0:2 zu sehen. Ein Unterschied zwischen dem Ansatz Treg:CD25⁻ 1:1 und Treg:CD25⁻ 0,5:1 konnte hingegen nicht festgestellt werden. n.d. = nicht durchgeführt

Verhältnis Treg:CD25 ⁻	Spender 1028	Spender 1002.1	Spender 1002.2	Spender 1020	Spender 1031
1:1	24147 (1306,08)	35545,33 (1784,08)	9028,67 (4830,98)	115995,00 (4916,92)	247079,67 (14192,55)
0,5:1	24528,33 (402,40)	n.d.	3585,33 (2114,57)	n.d.	218069,33 (13668,91)
0:2	58317 (7967,39)	62430,33 (3668,2)	20970,67 (3653,47)	187431,33 (11169,53)	221811,33 (10850,66)

**Abbildung 3.28: Exemplarischer funktioneller Test mit expandierten Zellen (Spender 1028; Tabelle 3.2).**

Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Triplika eines Einzelversuches. Es konnte ein signifikant höheres Wachstum der Zellen des Ansatzes Treg:CD25⁻ 0:2 gegenüber denen des Ansatzes Treg:CD25⁻ 1:1 festgestellt werden. Das Wachstum der Zellen in den Ansätzen Treg:CD25⁻ 1:1 und Treg:CD25⁻ 0,5:1 zeigte hingegen keinen Unterschied.

Tabelle 3.3 zeigt die Auswertung der funktionellen Tests von aus Buffy Coat-Präparaten isolierten Treg-Zellen, die direkt nach der Isolierung ohne Expansion in den Test eingebracht wurden. Zusätzlich zu den in Tabelle 3.2 gezeigten Ansätzen wurden hier als Kontrolle die Treg ohne Zugabe von Zielzellen getestet. Als weitere Kontrolle wurde ein Ansatz getestet, in dem nur die Zielzellen im Verhältnis 1:0 kultiviert wurden. Vergleicht man diese Kontrollen miteinander (Treg:CD25⁻ 0:1 und Treg:CD25⁻ 1:0) so fällt wie erwartet ein stärkeres Wachstum der Zielzellen (z.B. Spender 1043: 10899cpm) im Vergleich mit den Treg (z.B. Spender 1043: 1293cpm)

auf. Im Einzelversuch konnte aufgrund der Triplika ein signifikanter Unterschied für diesen Vergleich errechnet werden ($p=0,003$; Abb.3.29). Beim Vergleich der Ansätze Treg:CD25⁻ 1:1 und Treg:CD25⁻ 0:1 fällt bei zwei von vier Ansätzen ein stärkeres Wachstum des Ansatzes Treg:CD25⁻ 0:1 (z.B. Spender 1043: 10899cpm) gegenüber dem Ansatz Treg:CD25⁻ 1:1 (z.B. Spender 1043: 5916cpm) auf. Bei gleicher CD4⁺CD25⁻-Zellzahl und gleichen Kulturbedingungen proliferierten also die Zellen in dem Ansatz ohne Treg deutlich mehr. Außerdem ist hier beim Vergleich der Ansätze mit gleicher Gesamtzellzahl (Treg:CD25⁻ 1:1 und Treg:CD25⁻ 0:2) eine stärkere Proliferation der Zellen des Ansatzes ohne Treg in vier von vier Versuchen zu sehen (z.B. Spender 1043: Treg:CD25⁻ 1:1: 5916cpm gegenüber Treg:CD25⁻ 0:2: 27956cpm). Im Einzelversuch konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 3.29; $p=0,005$). Die p-Werte der nicht signifikanten Vergleiche im Einzelversuch lauten: Vergleich Treg:CD25⁻ 1:1 und Treg:CD25⁻ 0,5:1: $p=0,480$; Vergleich Treg:CD25⁻ 1:1 und Treg:CD25⁻ 0:1: $p=0,074$). Diese Ergebnisse können als Hinweis auf eine suppressive Wirkung der Treg auf die CD4⁺CD25⁻-Zellen gedeutet werden. Ein Unterschied zwischen den Ansätzen Treg:CD25⁻ 1:1 und Treg:CD25⁻ 0,5:1 war auch hier nicht zu erkennen.

Tabelle 3.3: Suppressionstest mit nicht-expandierten Treg und CD4⁺CD25⁻-Zellen.

Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Triplika. Eine Tendenz zu erhöhtem Zellwachstum des Ansatzes ohne Treg im Vergleich zu dem Ansatz mit Treg-Zellen bei gleicher Gesamtzellzahl ist beim Vergleich der Ansätze Treg:CD25⁻ 1:1 und Treg:CD25⁻ 0:2 auch hier zu sehen. Desweiteren ist ein nur sehr geringes Wachstum der Treg-Zellen im Ansatz Treg:CD25⁻ 1:0 zu erkennen. Ein Vergleich der Ansätze Treg:CD25⁻ 1:1 und Treg:CD25⁻ 0:1 zeigt in drei von vier Versuchen ein stärkeres Wachstum des Ansatzes ohne Treg bei gleicher Zielzellzahl. Ein Unterschied zwischen dem Ansatz Treg:CD25⁻ 1:1 und Treg:CD25⁻ 0,5:1 konnte auch hier nicht festgestellt werden. N.d. = nicht durchgeführt

Verhältnis Treg:CD25 ⁻	Spender 1042	Spender 1043	Spender 1044	Spender 1045
1:1	62925,67 (9818,65)	5916,00 (1351,55)	244,00 (169,56)	1860,00 (339,00)
0,5:1	76179,00 (11130,06)	5350,00 (1290,66)	337,33 (405,53)	1004,33 (412,57)
0:1	120333,00 (7898,89)	10899,00 (1214,39)	89,67 (29,28)	1932,67 (1462,22)
0:2	171310,33 (3047,70)	27956,00 (1344,47)	1078,33 (223,52)	13705,00 (5496,99)
1:0	n.d.	1293,00 (338,10)	n.d.	n.d.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass ein geringeres Wachstum der Treg-Zellfraktion im Vergleich zu der $CD4^+CD25^-$ -Fraktion auffiel. Zusätzlich war bei gleicher Zielzellzahl und bei gleicher Gesamtzellzahl das Wachstum der Ansätze ohne Treg in den meisten Versuchen deutlich höher. Die Auswertung der funktionellen Tests zeigte also möglicherweise eine leichte suppressive Wirkung der Treg gegenüber den $CD4^+CD25^-$ -Zellen. Diese war bei den Ansätzen ohne vorherige Expansion der Zellen deutlicher. Möglicherweise war auch hier die zu geringe Reinheit der Treg-Fraktion ein Problem, so dass das Ergebnis des Suppressionstest abgeschwächt wurde. Dieses Problem war bei nicht-expandierten Zellen weniger vorhanden, da vor Beginn des Tests keine Proliferation der Zellen stattfand.

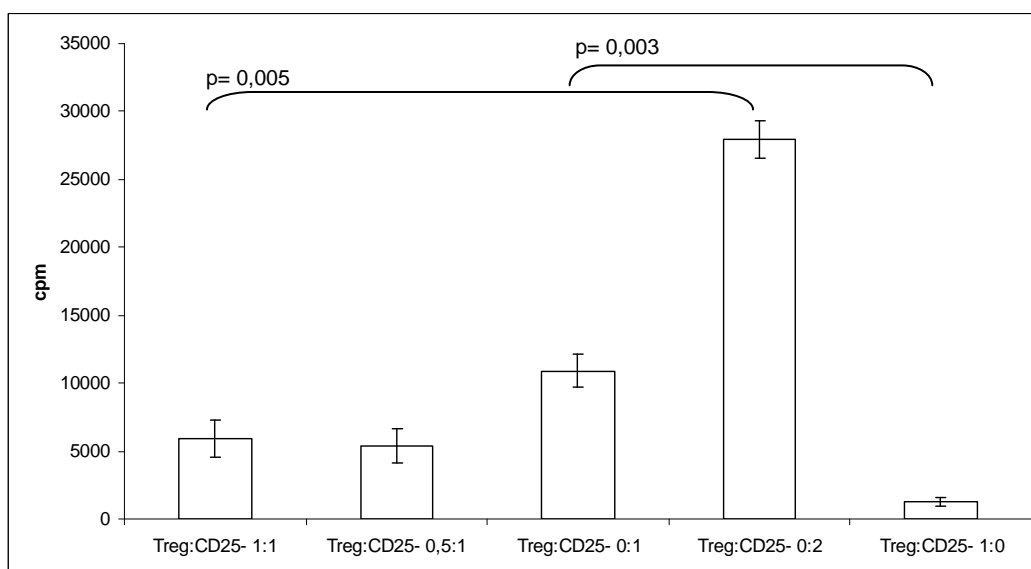


Abbildung 3.29: Exemplarischer funktioneller Test mit nicht expandierten Zellen (Spender 1043; Tabelle 3.3).

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Triplika. Der Ansatz Treg:CD25⁻ 1:0 zeigt die Anergie der Treg. Die Zellen in den Ansätzen mit Treg wiesen ein deutlich geringeres Wachstum im Vergleich zu den Zellen in den Ansätzen ohne Treg auf. Dies weist auf eine Suppression der Proliferation der $CD4^+CD25^-$ -Fraktion hin.

4. Diskussion

4.1 Treg-Messungen bei Patienten mit Multiplem Myelom (MM)

4.1.1 Validierung durchflußzytometrischer Protokolle zur Identifizierung von Treg

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit waren nur wenige Daten zu Treg bei hämatologischen Erkrankungen veröffentlicht. Insbesondere für das Multiple Myelom gab es keinerlei Daten im Bezug auf diese Zellen. Diese Arbeit sollte nun einen Beitrag zur Aufklärung der Rolle der Treg bei dieser Erkrankung leisten. Ein Problem war zunächst die Bereitstellung von Blut- und Knochenmarkproben der Patienten. Da es nicht möglich war, ausreichende Volumina für eine Aufreinigung der mononukleären Zellfraktion zu bekommen, mussten zunächst durchflußzytometrische Protokolle etabliert werden, mit deren Hilfe es möglich war die Treg aus Vollblut zu messen. Ein Vorteil einer Messung aus Vollblut ist neben der geringen hierfür notwendigen Zellzahl auch eine Vermeidung von möglichen Artefakten durch die Verwendung von Ficoll. Die hier etablierten Protokolle beinhalteten die Marker CD4⁺, CD25^{high}, CD62L⁺, CTLA-4⁺, CD45RO⁺, CD45RA⁺, CD27⁺ und CD127^{low}. Hierbei handelt es sich um Treg-spezifische Oberflächenmarker, die auch mit sehr kleinen Zellzahlen problemlos messbar sind. Im Gegensatz zu anderen Arbeiten, die sich mit der Analyse von Treg beschäftigen (Rancador et al., 2005; Chattopadhyay et al., 2006; Fozza et al., 2007; Kurooka et al., 2007) wurde der intrazelluläre Marker FOXP3, der bis heute oft zur Identifizierung von Treg verwendet wird, nicht verwendet. Die zweifelsfreie Identifizierung von Treg beim Menschen wird besonders dadurch erschwert, dass auf aktivierten T-Zellen der Marker CD25 in dem Maße hoch reguliert wird, dass eine Unterscheidung zwischen solchen Zellen und den Treg mit Hilfe der Marker CD4⁺ und CD25^{high} schwierig wird. Dieses Problem kann allerdings auch durch den Marker FOXP3 nicht gelöst werden, da auch er bei Aktivierung auf menschlichen T-Zellen stark exprimiert wird (Gavin et al., 2006; Mantel et al., 2006; Morgan et al., 2005; Walker et al., 2003; Pillai et al., 2007; Tran et al., 2007; Stockis et al., 2009). Generell ist also eine Kombination verschiedener Treg-spezifischer Marker notwendig. Für diese Arbeit waren des Weiteren zwei technische Probleme ausschlaggebend dafür, dass FOXP3 nicht zur Treg-Identifizierung genutzt wurde. Zum einen handelte es sich um die hierfür

notwendige intrazelluläre Färbung, für die die zu untersuchenden Zellen permeabilisiert und fixiert werden müssen. Durch eine solche Behandlung verschieben sich die für lebende Treg gesetzten durchflußzytometrischen Fenster so stark, dass eine Vergleichbarkeit von Messungen lebender und permeabilisierter Zellen nicht mehr gegeben ist. Zum anderen sind für eine intrazelluläre Färbung mehr Zellen notwendig als für eine Färbung der Oberflächenmarker lebender Zellen. Dies liegt in den zusätzlichen Waschschritten bei der intrazellulären Färbung begründet und war aufgrund der sehr kleinen Probenvolumina in der vorliegenden Arbeit ein Problem. Ebenfalls bedingt durch die kleinen zur Verfügung stehenden Zellzahlen waren auch funktionelle Tests der Treg bei MM-Patienten im Verlauf der Arbeit nicht möglich. Um trotzdem sicherzustellen, dass es sich bei den gemessenen Zellen tatsächlich um Treg handelt, wurden die verwendeten durchflußzytometrischen Fenster den in der Literatur gezeigten Fenstern angepasst (Baecher-Allen et al., 2005; Prabhala et al., 2006; Sakaguchi, 2004; Beyer et al., 2006). Die so definierte Zellfraktion wurde in den genannten Arbeiten bereits auf suppressive Aktivität und FOXP3-Positivität getestet und als Treg identifiziert. Zur Vermeidung falsch positiver Signale wurde für jeden Marker eine Isotypkontrolle gemessen. Zusätzlich wurden die erstellten durchflußzytometrischen Protokolle zunächst durch die Reproduktion bereits beschriebener Daten validiert. Hierfür wurden die Treg-Zahlen bei Patienten mit soliden Tumoren (BK-Patienten) und normalen Spendern verglichen. Im Gegensatz zur Situation bei hämatologischen Erkrankungen war bereits zu Beginn der Arbeit eine Erhöhung der prozentualen Treg-Zahlen bei soliden Tumoren mehrfach veröffentlicht (Woo et al., 2001; Woo et al., 2002; Wolf et al., 2003; Okita et al., 2005).

Wie erwartet ergab sich für die BK-Patienten im Vergleich zu normalen Spendern ein signifikant erhöhter prozentualer Treg Wert. Eine Erhöhung der absoluten Treg-Zahl bei den untersuchten Patienten, wie sie von Wolf et al. (2003) beschrieben wurde, konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden. Möglicherweise liegt diese Diskrepanz darin begründet, dass Wolf et al. (2003) in ihrer Arbeit nicht ausschließlich Proben von BK-Patienten verwendeten. Die verwendete Patientengruppe beinhaltete außerdem noch neun weitere solide Tumorarten wie beispielsweise: Mammakarzinom, kolorektales Karzinom und Magenkarzinom. Außerdem untersuchten Wolf et al. (2003) Proben von therapierten Patienten, in

dieser Arbeit wurden hingegen ausschließlich Proben von unbehandelten Patienten analysiert, was eine Erhöhung der Treg-Zahlen durch Therapieeinfluß ausschließt.

Zusätzlich zu den prozentualen Treg-Zahlen sollten in dieser Arbeit auch die absoluten Zahlen bestimmt werden. Hierzu gibt es bis heute kaum Veröffentlichungen. Die im späteren Verlauf dieser Arbeit erschienenen Artikel zum Thema Treg bei MM-Patienten befassen sich fast ausschließlich mit prozentualen Treg-Werten (Beyer et al., 2006; Prabhala et al., 2006). Nur die Arbeit von Quach et al. (2008) zeigte ebenfalls absolute Zahlen von 18 MM-Patienten. Durch die Anpassung der verwendeten Methoden an sehr geringe Zellzahlen war es in der vorliegenden Arbeit möglich, Proben von 43 MM-Patienten zu messen und zu analysieren.

4.1.2 Identifizierung der gemessenen Zellfraktion als Treg

Die in dieser Arbeit als Treg bezeichneten Zellen waren (mit Ausnahme des Markers CD45RA) zu 70,8-98,4% positiv für die in Kapitel 4.1.1 aufgeführten Treg-spezifischen Marker. Dieses Ergebnis und die in Kapitel 4.1.1 beschriebene Validierung der Messprotokolle durch die Reproduktion der Ergebnisse für solide Tumore zeigen, dass es sich bei der in dieser Arbeit analysierten Zellfraktion um die in der Literatur beschriebenen Treg handelt. In der Literatur wird hierbei allerdings zwischen naiven- (CD45RA⁺) und Memory-Treg (CD45RO⁺) unterschieden. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden beide Marker gemessen. Dabei ergab sich eine 94,1%ige Positivität für den Marker CD45RO und eine nur 9,5%ige Positivität für den Marker CD45RA.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die in dieser Arbeit als Treg bezeichneten Zellen hauptsächlich „memory“-Treg waren. Dies ist möglicherweise durch die bei normalen Spendern kaum nachweisbare Anzahl naiver Treg im peripheren Blut zu erklären (Beyer et al., 2006). Seddiki et al. (2006) beschrieben naive Treg als weniger stark CD25 positiv, so dass in der vorliegenden Arbeit das durchflußzytometrische Fenster zur Treg-Identifizierung möglicherweise zu sehr auf die CD25^{high}-Zellen gesetzt war, um die naiven Treg zu erfassen. Dies geschah zur Vermeidung einer Kontamination mit aktivierten T-Zellen. Die in dieser Arbeit getroffenen Aussagen beziehen sich demnach also vornehmlich auf „memory“-Treg.

Hierbei wäre es möglich, dass einige der untersuchten „memory“-Treg der MM-Patienten durch längeren Kontakt mit dem Tumor induziert wurden und somit eine Anti-Tumor-Antwort erfolgreich und langfristig verhindert wurde. Besonders diese Treg könnten sich negativ auf den Erfolg einer Therapie auswirken und sollten daher näher untersucht werden. Möglicherweise beziehen sich auch die Unterschiede zwischen Treg bei hämatologischen Erkrankungen und bei soliden Tumor-Erkrankungen besonders auf diese „memory“-Treg, die beim Schutz des jeweiligen Tumors vor einer Anti-Tumor-Antwort von Bedeutung sind.

4.1.3 Treg exprimieren CD85j

Eine Messung des Markers CD85j ergab eine 97,4%ige, schwache Positivität der Treg. Da es sich bei CD85j um ein negativ immunregulierendes Protein handelt spielt es möglicherweise auch bei der Suppression von Immunantworten durch Treg-Zellen eine Rolle. Als Ligand für CD85j ist unter anderem HLA-G bekannt (Gonen-Gross et al., 2005). Bereits 2001 fanden Ibrahim et al. eine Erhöhung der HLA-G Expression beim Nieren-Zell-Karzinom. Durch die Expression von HLA-G ist es Tumorzellen möglich, Immunfunktionen zu modulieren und somit einer Immunantwort zu entgehen (Rebmann et al., 2007). Auch Treg werden von Tumoren rekrutiert, um die Anti-Tumor-Immunität abzuwehren (Curiel et al., 2004). Möglicherweise ist hierbei die Bindung von HLA-G an CD85j von Bedeutung.

In ihrer Arbeit von 2009 berichten Huang et al. über einen neuen Typ von Treg, der HLA-G produziert. Auch diese Zellen zeigen suppressive Fähigkeiten und könnten so möglicherweise ebenfalls den Tumor vor einer Anti-Tumor-Antwort schützen. HLA-G und CD85j scheinen also im Zusammenhang mit Treg eine Rolle zu spielen. Weitergehende Versuche zu diesem Thema könnten helfen, Anti-Tumor-Antworten zu unterstützen, bislang sind die Daten allerdings noch unzureichend, so dass der genaue Zusammenhang von HLA-G, CD85j und Treg noch weitgehend unklar bleibt.

4.1.4 Treg-Zahlen im peripheren Blut von MM-Patienten

4.1.4.1 Vergleich der Treg-Zahlen von normalen Spendern und MM-Patienten

In den hier vorliegenden Untersuchungen konnte eine signifikante Erhöhung der prozentualen Treg-Zahl nur dann beobachtet werden, wenn die Gruppe der MM-Patienten sowohl behandelte als auch nicht behandelte Patienten umfasste. Bei einem Vergleich von ausschließlich unbehandelten Patienten mit normalen Spendern konnte kein Unterschied festgestellt werden.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, gab es zu Beginn dieser Arbeit noch keine Literatur zu Treg beim Multiplen Myelom. Im Verlauf der Arbeit erschienen allerdings erste divergente Veröffentlichungen, mit denen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verglichen werden konnten. Eine wichtige Arbeit zu diesem Thema veröffentlichten Beyer et al. (2006). Im Gegensatz zu der hier vorgelegten Promotion fanden sie in ihrer Arbeit eine erhöhte prozentuale Treg-Zahl im peripheren Blut von MM-Patienten, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Patienten beim Vergleich mit normalen Spendern festgestellt wurde. Eine Arbeit von Prabhala et al. (2006) zeigte hingegen signifikant erniedrigte prozentuale Treg-Zahlen bei unbehandelten MM-Patienten im Vergleich zu normalen Spendern.

Möglicherweise sind die unterschiedlichen Ergebnisse dieser beiden Arbeitsgruppen auf unterschiedliche Techniken bei der Identifizierung der Treg-Zellen zurückzuführen. Prabhala et al. (2006) verwendeten in ihren Versuchen die Marker CD4⁺ und FOXP3⁺ zur Identifizierung der Treg. Es wäre also möglich, dass hier auch CD25⁻-Zellen mit in die Wertung eingingen. Beyer et al. (2006) benutzten zusätzlich zu den Markern CD4⁺ und FOXP3⁺ den Oberflächenmarker CD25^{high} und die Marker CTLA-4, GITR und OX40 intrazellulär. In ihrer Arbeit unterschieden sie zwischen naiven und Memory-Treg und fanden zusätzlich zur Erhöhung der Memory-Treg auch eine Erhöhung der naiven Treg. Durch die Verwendung dieser unterschiedlichen Marker kann es auch zu Verschiebungen bezüglich der durchflußzytometrischen Fenster gekommen sein, so dass die untersuchten Treg-Populationen dieser beiden Arbeiten möglicherweise nicht komplett gleich sind.

Eine der neuesten Veröffentlichungen zu diesem Thema stammt von Feyler et al. (2009). Ihre Ergebnisse korrelieren mit denen von Beyer et al. (2006). Auch sie

fanden erhöhte prozentuale Werte für naive und Memory-Treg bei Patienten mit Multiplem Myelom. Im Unterschied zu Beyer et al. (2006) konnten sie allerdings auch eine höhere Treg-Frequenz bei therapierten Patienten im Gegensatz zu nicht therapierten Patienten zeigen. Ähnlich wie die Gruppe Beyer et al. (2006) achteten auch Feyler et al. (2009) neben den Treg des memory Phänotypes auch auf solche mit einem naiven Phänotyp. Seddiki et al. (2006) beobachteten, dass naive Treg weniger stark CD25 positiv waren, als Memory-Treg. Um naive Treg messen zu können müssen die durchflußzytometrischen Fenster also so eingestellt werden, dass nicht ausschließlich CD25^{high}-positive Zellen gemessen werden. Beide Arbeiten scheinen also ähnliche Messprotokolle verwendet zu haben.

Vergleicht man nun die Ergebnisse dieser drei vorgestellten Arbeiten mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, so zeigt sich eine Korrelation mit den Ergebnissen von Feyler et al. (2009). In beiden Fällen zeigten sich höhere prozentuale Treg Werte für therapierte Patienten im Vergleich zu nicht therapierten. Ein Unterschied besteht allerdings in den Ergebnissen für unbehandelte Patienten. Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit konnten Beyer et al. (2006) und Feyler et al. (2009) auch hier erhöhte Treg Werte feststellen. Möglicherweise ist ein solches Resultat in dieser Promotion nicht zu sehen, weil die Fallzahl der unbehandelten Patienten zu klein ist (n=6), um eine Signifikanz zu erreichen. Eine weitere Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte auch der Verzicht auf die Verwendung von Ficoll in der vorliegenden Arbeit sein. Im Gegensatz zu den drei oben beschriebenen Veröffentlichungen wurde in dieser Promotion statt einer Aufreinigung der mononukleären Zellfraktion mittels Ficoll nur eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Artefakte, die durch einen selektiven Verlust einer Zellpopulation während der Aufreinigung der mononukleären Zellfraktion durch die Verwendung von Ficoll entstehen können, können in der vorliegenden Arbeit also ausgeschlossen werden.

Ein Problem bei den in der Literatur gezeigten Daten besteht darin, dass keine absoluten, sondern nur prozentuale Treg-Zahlen angegeben sind. Um die Rolle der Treg beim Multiplen Myelom genau beurteilen zu können sind allerdings beide Angaben wichtig. In dieser Promotion wurden demnach bei jeder Messung der prozentualen Treg-Werte auch die absoluten Zahlen bestimmt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen normalen Spendern und MM-Patienten bezüglich der absoluten Zellzahlen festgestellt werden. Tendenziell war allerdings

beim Vergleich der MM-Patienten (mit und ohne Therapie zusammengefasst) mit den normalen Spendern ein niedriger Treg Wert für die MM-Patienten zu sehen ($p=0,051$). Diese Tendenz war bei demselben Vergleich mit ausschließlich unbehandelten Patienten weniger stark ausgeprägt, was möglicherweise durch die sehr niedrigen Fallzahlen ($n=3$) bedingt ist.

Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit den oben beschriebenen Arbeiten von Beyer et al. (2006), Prabhala et al. (2006) und Feyler et al. (2006) ist leider nicht möglich, da keine dieser Arbeitsgruppen Daten zu absoluten Zahlen veröffentlichte. Neben der vorliegenden Dissertation veröffentlichte einzig die Gruppe Quach et al. (2008) absolute Treg-Zahlen beim Multiplen Myelom. Quach et al. (2008) beschreiben in ihrem Artikel absolute Treg-Zahlen bei rezidivierenden MM-Patienten im Bezug auf eine Behandlung mit Lenalidomid und Dexamethason. Generell konnten sie eine reduzierte Anzahl Treg im Blut von MM-Patienten mit einem Rezidiv im Vergleich zu normalen Spendern messen. Bei Patienten, die gut auf die Therapie mit Lenalidomid ansprachen konnte eine Normalisierung dieser Zellen gemessen werden.

Die in dieser Arbeit gefundene Tendenz, dass die Gruppe der MM-Patienten, bei denen nicht zwischen therapierten und nicht-therapierten Individuen unterschieden wurde, eine niedrigere Treg-Zahl aufwies als normale Spender, korreliert also mit den Daten von Quach et al. (2008). Die fehlende Signifikanz lässt sich eventuell dadurch erklären, dass hier sowohl Patienten mit einem Rezidiv als auch solche ohne Rezidiv zusammengefasst wurden und somit eine Abschwächung des Effektes stattgefunden hat. Möglicherweise ist die niedrige absolute Zellzahl in dieser Promotion aber auch auf die Auswirkungen einer Chemotherapie zurückzuführen, der sich einige der Patienten unterzogen hatten.

Betrachtet man nun die Ergebnisse der Messung prozentualer und absoluter Treg-Zahlen, also einen eher niedrigeren absoluten Wert und einen, zumindest bei therapierten Patienten erhöhten prozentualen Wert, so kann man spekulieren, dass Treg unter dem Einfluss einer Chemotherapie eventuell weniger stark absterben, als andere $CD4^+$ -Zellen. Diese Möglichkeit wird von der Arbeit von Szczepanski et al. (2009) unterstützt. Sie untersuchten in ihrer Arbeit Treg bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie und konnten zeigen, dass Patienten mit einer niedrigeren Treg-Frequenz besser auf eine Chemotherapie ansprachen, als andere. Auch während einer Chemotherapie bei Patienten mit eher höheren Treg-Zahlen konnten sie diese Erhöhung weiterhin messen, so dass sie eine Resistenz der Treg

gegenüber einer konventionellen Chemotherapie vermuteten. Eine weitere Hypothese, die die in der vorliegenden Arbeit gemessenen absoluten und prozentualen Treg-Werte erklärt, wäre eine schnellere Rekonstitution der Treg gegenüber anderen CD4⁺-Zellen nach einer Chemotherapie. Hierfür sprechen die Ergebnisse der Arbeitsgruppe Atanackovic et al. (2008). Sie untersuchten die Rekonstitution von Treg nach allogener Stammzelltransplantation (SCT) bei MM-Patienten und fanden vollständig rekonstituierte Treg-Zahlen vor der Rekonstitution der restlichen CD4⁺-Zellen.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die Rolle der Treg bei hämatologischen Erkrankungen, wie dem Multiplen Myelom noch nicht abschließend geklärt werden konnte. Eine Erhöhung der prozentualen Treg-Zahlen durch eine Therapie oder die Krankheit selber könnte allerdings zu einer Abschwächung der Anti-Tumor-Antwort führen und somit einen negativen Einfluss haben. Bei einer Behandlung ist eine eventuelle bessere Verträglichkeit einer Chemotherapie oder eine schnellere Rekonstitution der Treg eventuell von Bedeutung für den Therapieerfolg. Es wäre also wichtig den Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse der verschiedenen Arbeiten im Bezug auf die prozentualen Treg-Zahlen zu erfahren, wobei eventuell auch Zellen wie beispielsweise DZs berücksichtigt werden müssen, mit denen Treg interagieren und die eventuell auch für eine Erhöhung oder Erniedrigung der prozentualen Zahl der Treg verantwortlich sein könnten.

4.1.4.2 Messung der Treg-Zahlen im peripheren Blut von MM-Patienten ohne Therapie, mit Chemotherapie und mit Hochdosis-Chemotherapie

Da die in Kapitel 4.1.4.1. besprochenen Ergebnisse auf einen eventuellen Einfluss einer Therapie auf die prozentualen und absoluten Treg-Zahlen hindeuten, sollte im nächsten Schritt ein Vergleich der Treg-Zahlen bei Patienten mit Chemotherapie und ohne Chemotherapie stattfinden. Für diese Analyse, wurden die Proben der MM-Patienten in die Gruppen: „ohne Therapie“, „CTX“ und „HD-CTX“ eingeteilt und verglichen. Für die prozentuale Auswertung ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen „ohne Therapie“ und „CTX“ und den Gruppen „ohne

Therapie“ und „HD-CTX“. Der Vergleich der Therapiegruppen untereinander zeigte hingegen keine Unterschiede.

Beyer et al. (2006) fanden bei ihrem Vergleich der prozentualen Treg-Zahlen von unbehandelten und behandelten MM-Patienten im Gegensatz zu dieser Arbeit keine signifikanten Unterschiede. Sie fanden für unbehandelte Patienten einen Wert von im Median 8%, für behandelte Patienten 9,6% bzw. 10,6% (Aufteilung nach Stadien). In der vorliegenden Arbeit wurden Werte von im Median 4,46% für unbehandelte, 10,14% für die Gruppe CTX und 8,3% für die Gruppe mit HD-CTX gemessen. Bei beiden Messungen sind die Werte der Gruppen mit Therapie höher. Möglicherweise liegt der Grund dafür, dass Beyer et al. (2006) keinen signifikanten Unterschied fanden auch hier an der unterschiedlichen Definition der Treg (siehe Kapitel 4.1.4.1). Eine weitere Möglichkeit um die Unterschiede zu erklären, könnte in der Auswahl der gemessenen Patientenproben liegen. Beyer et al. (2006) fassen in ihren Gruppen der behandelten Patienten verschiedene Therapien zusammen. Hierzu zählen sowohl Chemotherapien, als auch alternative Therapien wie beispielsweise Behandlungen mit Thalidomid oder Bortezomib. Feyler et al. (2009) konnten in ihrer Arbeit im Gegensatz zur Arbeitsgruppe Beyer et al. (2006) eine Erhöhung der prozentualen Treg-Zahlen bei therapierten Patienten im Vergleich zu nicht therapierten Patienten zeigen. Patienten, die mit Thalidomid behandelt wurden, zeigten zudem höhere prozentuale Treg-Werte, als solche, die mit anderen Substanzen behandelt wurden. Eine weitere Erklärung für die Diskrepanzen zwischen der vorliegenden Arbeit und der Arbeit von Beyer et al. (2006) könnten auch die Fallzahlen sein. In beiden Gruppen waren die Fallzahlen für die Patienten ohne Therapie unter 10 (Beyer et al. (2006): n=8; diese Arbeit: n=6). Im Gegensatz dazu konnten Feyler et al. (2009) eine Fallzahl von 42 für unbehandelte Patienten aufweisen.

Weder Beyer et al. (2006) noch Feyler et al. (2009) veröffentlichten absolute Treg-Zahlen. Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen absoluten Treg-Zahlen ergaben keinen signifikanten Unterschied beim Vergleich der Gruppen ohne CTX, mit CTX und mit HD-CTX. Tendenziell ist aber auch hier eine Abnahme der absoluten Treg-Anzahl unter CTX zu erkennen, die unter HD-CTX noch deutlicher zu sein scheint. Ein signifikanter Unterschied ist vielleicht aufgrund der kleinen Fallzahl von n=3 für die Gruppe ohne Therapie nicht zu sehen. Auch eine Analyse der absoluten CD4⁺-

und CD8⁺-Zellzahlen ergab durch die niedrigen Fallzahlen nur Tendenzen. Diese zeigten eine geringere CD4⁺-Zahl bei therapierten Patienten im Vergleich zu untherapierten. Die CD8⁺-Zahlen hingegen zeigen diese Tendenzen nicht. Eine schnellere Rekonstitution der CD8⁺-Zellen im Vergleich zu den CD4⁺-Zellen ist allerdings in der Literatur beschrieben (Atanackovic et al., 2008).

Der Vergleich der prozentualen und absoluten Treg-Zahlen könnte aber auch in diesem Fall auf eine bessere Verträglichkeit der Chemotherapie bezüglich der Treg im Gegensatz zu den anderen CD4⁺-Zellen oder auf eine schnellere Rekonstitution der Treg nach Therapie hinweisen. Um eine Hemmung der Anti-Tumor-Antwort durch die Treg zu verhindern ist also möglicherweise eine gezielte Verminderung der Treg-Anzahlen vor Beginn der Chemotherapie nötig. Auch eine Beobachtung der Treg-Werte nach Rekonstitution würde möglicherweise weitere Ergebnisse liefern, durch die der Erfolg einer Chemotherapie bzw. allogenen Stammzelltransplantation verbessert werden könnte.

4.1.4.3 Möglicher Einfluß weiterer Krankheitsparameter auf Treg-Zahlen im peripheren Blut von MM-Patienten

Die Ergebnisse der in Kapitel 4.1.4.2 diskutierten Messungen zeigten für die in dieser Arbeit gemessenen Proben eine Erhöhung der prozentualen Treg-Zahlen bei mit einer Chemotherapie behandelten Patienten im Vergleich zu unbehandelten Patienten. Dies scheint auf einen möglichen Einfluss der Therapie auf die Treg-Frequenz hinzudeuten. Möglicherweise ist hier aber auch eine positive Korrelation der Treg-Frequenzen mit dem Krankheitsverlauf zu sehen, da unbehandelte Patienten zumeist am Anfang der Erkrankung stehen und somit eventuell eine geringere Krankheitslast aufweisen, als Patienten, die sich bereits einer Therapie unterziehen. Um diese Möglichkeit näher betrachten zu können, wurden die gemessenen Proben nun im Bezug auf die Krankheitsstadien nach Durie und Salmon und die Aktivität der Krankheit, definiert durch die Menge des gebildeten Paraproteins im Blut und nach Absprache mit dem behandelnden Arzt anderer Anzeichen einer aktiven Krankheit, hin überprüft.

Bezüglich der Krankheitsstadien wurde bereits bei anderen hämatologischen Erkrankungen wie dem Non-Hodgkin-Lymphom, der akuten myeloischen Leukemie

und der chronischen lymphatischen B-Zell-Leukemie eine stadiumabhängige Erhöhung der Treg Zahl gefunden (Beyer et al., 2005; Motta et al., 2005; Yang et al., 2006; Wang et al., 2005; Mittal et al., 2008). Beim MM konnten in dieser Arbeit hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Treg-Zahlen verschiedener Stadien festgestellt werden. Diese Resultate werden durch die von Beyer et al. (2006) gefundenen Daten unterstützt. Beim Vergleich der prozentualen Treg-Zahlen bezüglich der Krankheitsstadien beim MM fanden sie ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Feyler et al. (2009) zeigten in ihrer Arbeit allerdings eine Erhöhung der Treg-Frequenz bei Patienten mit einer Krankheit des zweiten Stadiums im Gegensatz zu solchen im ersten Stadium. Für die Erhebung dieser Daten verwendeten sie ausschließlich Proben von neu diagnostizierten Patienten. Der errechnete Signifikanzwert lag bei dieser Auswertung allerdings bei $p = 0,049$ und ist somit gerade noch signifikant. Ob eine Korrelation der Treg-Frequenz mit dem Krankheitsstadium besteht bleibt also weiterhin offen und gibt Anlass für weitere Untersuchungen zu diesem Thema. Ein Hinweis auf eine tatsächliche Korrelation der Treg-Frequenz mit dem Krankheitsverlauf konnte bislang im Hinblick auf die Krankheitsstadien nicht gefunden werden.

Auch ein Vergleich der MM-Proben bei aktiver bzw. nicht aktiver Erkrankung ergab in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Unterschiede. Im Unterschied dazu zeigten Feyler et al. (2009) in ihrer Publikation eine positive Korrelation der Paraproteinwerte mit der Treg-Frequenz. Diese Unterschiede sind möglicherweise dadurch zu erklären, dass die Einteilung der Werte in diesen beiden Arbeiten unterschiedlich war. Feyler et al. (2009) machen zu ihrer Einteilung keine weiteren Angaben, so dass ein genauerer Vergleich schwierig wird. Eine weitere Möglichkeit wäre auch die in der vorliegenden Arbeit relativ geringe Fallzahl von $n=6$ für die Proben mit aktiver Erkrankung, wodurch eine Signifikanz möglicherweise nicht zu sehen ist.

Auch im Bezug auf die Aktivität der Krankheit konnten bislang also noch keine eindeutigen Ergebnisse gezeigt werden.

Es bleibt also offen, ob die Treg-Frequenz mit dem Krankheitsverlauf korreliert. Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnisse sowie die Resultate der Gruppe Beyer et al. (2006) geben eher Hinweise darauf, dass es zumindest im Bezug auf die

Stadien der Erkrankung keinen Zusammenhang mit der Treg-Frequenz gibt. Feyler et al. (2009) hingegen sehen diese Korrelation. Weitere Arbeiten zu diesem Thema sind also erforderlich, um einen möglichen Zusammenhang zu verdeutlichen. Sollte es eine Korrelation geben, so ist dies bei der Auswahl der individuellen Therapie zu beachten. Der negative Einfluss der Treg auf eine Anti-Tumor-Antwort könnte so mit dem Krankheitsverlauf steigen. Auch wenn die Treg-Frequenz eher durch die Therapie selber beeinflusst wird, kann ein besseres Verständnis dieses Zusammenhangs den Therapieerfolg möglicherweise dadurch verbessern, dass gezielt auch Medikamente zur Depletion oder teilweisen Depletion der Treg gegeben werden könnten.

4.1.5 Unterschiede zwischen Treg-Zahlen im peripheren Blut und im Knochenmark von MM-Patienten

Da sich das MM primär im Knochenmark manifestiert und es bis heute nur sehr wenige Veröffentlichungen zu Treg-Zahlen im Knochenmark von MM-Patienten gibt, wurden zusätzlich zu den Blutproben auch Knochenmarkproben auf ihre prozentualen und absoluten Treg-Zahlen hin überprüft.

In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl für die prozentuale als auch für die absolute Treg-Zahl im Knochenmark ein signifikant niedrigerer Wert (4,6% bzw. 8 Treg/ μ l) im Vergleich zum peripheren Blut (7,05% bzw. 32,38 Treg/ μ l) gefunden. Im Gegensatz dazu fanden Zou et al. (2004) bei normalen Spendern einen signifikant höheren Prozentsatz Treg im Knochenmark im Vergleich zum peripheren Blut. Zusätzlich konnten sie zeigen, dass durch die Behandlung der Spender mit Granulozyten-Kolonie stimulierendem Faktor (G-CSF) die Treg-Zahl im peripheren Blut signifikant erhöht, im Knochenmark hingegen signifikant erniedrigt wurde. Dies könnte eine Erklärung für die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse sein, da viele der verwendeten Proben von Patienten stammten, die nach Hochdosis-Chemotherapie auch G-CSF bekamen. Auch einige der mit konventioneller Chemotherapie behandelten Patienten erhielten G-CSF. Der Verdacht liegt also nahe, dass der hier gezeigte Effekt eine Folge der Behandlung und nicht der Krankheit ist. Der Einsatz von G-CSF würde demnach zu einer Erniedrigung der Treg-Zahl im Knochenmark und einer Erhöhung dieses Wertes im Blut führen. Eine weitere Arbeit, die sich mit dem Vergleich der prozentualen Treg-Zahlen im Knochenmark und im peripheren

Blut beschäftigte ist die Gruppe Beyer et al. (2006). Hier wurde kein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl der Treg im peripheren Blut und im Knochenmark gefunden. Möglicherweise ist dies durch die geringen Fallzahlen von jeweils 6 Patienten zu erklären, durch die keine Signifikanzen deutlich wurden. Feyler et al. (2009), die ebenfalls Treg-Messungen im peripheren Blut und Knochenmark durchführten bestätigten hingegen die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse. Sie konnten bei 20 MM-Patienten signifikant höhere Treg-Frequenzen im peripheren Blut im Vergleich zum Knochenmark zeigen. Feyler et al. (2009) erklären diese Ergebnisse mit dem im Vergleich zum peripheren Blut unterschiedlichen Mikromillieu im Knochenmark, welches eventuell auf die Treg-Frequenz einwirken kann.

Die wenigen Arbeiten, die sich bislang mit Treg im Knochenmark von MM-Patienten beschäftigt haben, zeigen also divergente Ergebnisse. Möglicherweise lassen sich diese Diskrepanzen auch durch verschieden starke Blutbeimengungen während der Abnahme der Knochenmarkproben erklären, die zu einer Verschiebung der prozentualen und absoluten Treg-Zahl führen könnten. Die Autoren der hier diskutierten Artikel machen leider keine Angaben zur Blutbeimengung in ihren Knochenmarkproben. In der vorliegenden Arbeit wurden Proben mit einer Blutbeimengung unter 30% verwendet. Es wäre also möglich, dass die hier gezeigten Ergebnisse durch diese Blutbeimengung beeinflusst wurden.

Es bedarf also auch hier weiterer Studien um diese Frage endgültig zu klären. Hierbei sollte die Rolle von G-CSF ebenfalls genauer untersucht werden. Sollte tatsächlich eine Ausschwemmung der Treg aus dem Knochenmark ins Blut stattfinden, so muss dies bei einer Therapie berücksichtigt werden.

Zur Analyse des Einflusses der Chemotherapie auf die Treg-Zahlen im Knochenmark wurden die Proben analog zu den Proben des peripheren Blutes in die Gruppen: „ohne Therapie“, „CTX“ und „HD-CTX“ eingeteilt. Eine solche Auswertung ist bislang in der Literatur nicht zu finden. In dieser Arbeit ergaben sich im Gegensatz zu den Ergebnissen der Blutproben keine signifikanten Unterschiede zwischen therapierten und nicht-therapierten Patienten. Da die Streuung der Werte für die Gruppe ohne Therapie hier höher ist als im peripheren Blut ist die Fallzahl dieser Gruppe hier möglicherweise zu klein (prozentual: n=9; absolut: n=6) um einen signifikanten Unterschied zu zeigen. Eine weitere Erklärung für diese Ergebnisse wäre aber auch

der gegenläufige Effekt einer schnelleren Rekonstitution der Treg gegenüber anderen CD4⁺-Zellen (Erhöhung der prozentualen Treg-Zahl) und der Wirkung von G-CSF auf die Treg im Knochenmark, durch dessen Anwendung es zu einer Erniedrigung der Treg Zahl kommen kann.

Um die für Treg gemessenen Werte im Zusammenhang mit anderen Zellen beurteilen zu können, wurden auch die absoluten Werte für die CD4⁺- und die CD8⁺-Zellen im Knochenmark ermittelt. Wie im peripheren Blut, ergaben sich für die CD8⁺-Zellen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen: „ohne Therapie“, „CTX“ und „HD-CTX“. Für die CD4⁺-Zellen ergab sich beim Vergleich der Gruppen „CTX“ und „HD-CTX“ ein signifikant höherer Wert für die Gruppe „CTX“. Wie im peripheren Blut ist auch hier eine schnellere Rekonstitution der CD8⁺-Zellen nach Chemotherapie im Vergleich zu den CD4⁺-Zellen zu sehen. Eine höhere CD4⁺-Zellzahl für die Gruppe ohne Therapie im Vergleich zu den Gruppen mit Therapie ist hier nicht zu erkennen, da die Werte für die Gruppe ohne Therapie stark streuen und deshalb keine Signifikanzen erreicht werden konnten.

Eine Einteilung der MM-Knochenmarkproben nach Stadien ergab keine signifikanten Unterschiede der prozentualen und absoluten Treg-Werte zwischen den einzelnen Gruppen. Auch eine Einteilung nach aktiver und nicht aktiver Erkrankung zeigte keine Signifikanzen beim Vergleich der Treg-Werte.

Die Daten für das Knochenmark lieferten wie bereits die Werte für das periphere Blut keine Hinweise auf einen Einfluss des MM auf die prozentuale oder absolute Treg-Zahl. Eine Erklärung für die hier gezeigten Daten könnte aber eine Beeinflussung durch Therapiemaßnahmen, wie Chemotherapie und G-CSF sein. Besonders ein eventueller Effekt von G-CSF auf Treg könnte interessant für weitere Versuche sein. Möglicherweise werden Treg wie auch die Stammzellen durch diesen Faktor aus dem Knochenmark ins Blut abgegeben. G-CSF wird unter anderem nach Chemotherapie gegeben um einen schnelleren Wiederaufbau des geschwächten Immunsystems zu erreichen und Infektionen vorzubeugen. Dieser Effekt könnte durch Treg negativ beeinflusst werden, somit besteht auch hier eventuell eine klinische Relevanz.

4.1.6 Vergleich der Treg-Zahlen im peripheren Blut von BK-Patienten (solider Tumor) und MM-Patienten (hämatologische Erkrankung).

Für die Etablierung der durchflußzytometrischen Treg-Messprotokolle wurden Blutproben von 13 unbehandelten BK-Patienten analysiert und mit denen von normalen Spendern verglichen. Wie in der Literatur beschrieben, konnte eine Erhöhung der Treg-Frequenz bei diesem Vergleich gezeigt werden.

Vergleicht man nun die prozentuale und absolute Treg-Zahl von BK-Patienten und MM-Patienten, so zeigt sich prozentual ein signifikant höherer Wert für die BK-Patienten. Bezogen auf die absolute Zellzahl konnte hingegen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Anhand der hier verwendeten Proben lässt sich also ein Unterschied zumindest in der prozentualen Treg-Zahl bei der hämatologischen Erkrankung MM und der soliden Tumorerkrankung BK feststellen. Möglicherweise ist die Erhöhung der Treg-Frequenz bei soliden Tumorerkrankungen stärker ausgeprägt als bei hämatologischen Erkrankungen, so dass auch bei geringeren Fallzahlen bereits Signifikanzen zu sehen sind. Dies würde bedeuten, dass die Treg-Frequenzen sowohl bei soliden Tumoren als auch bei hämatologischen Erkrankungen erhöht sind. Speziell beim Multiplen Myelom steht diese Erhöhung allerdings weiterhin zur Diskussion. Es wäre möglich, dass das spezielle Mikromillieu eines soliden Tumors für die Treg-Erhöhung verantwortlich ist und es somit tatsächlich einen Unterschied zu hämatologischen Erkrankungen gibt. Banham et al. (2006) veröffentlichten bereits 2006 ihre These, dass die unterschiedlichen Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen bezüglich Treg-Anzahl und Funktionalität auf die Wechselwirkungen zwischen Treg und anderen Zellpopulationen sowie Zytokinen im Tumor-Mikromillieu zurück zuführen sein könnten.

4.1.7 Möglicher Einfluß einer Immuntherapie auf Treg-Zahlen bei MM-Patienten

Anhand von zwei Patienten, die man mit einer Vakzine aus Id-beladenen dendritischen Zellen behandelt hatte, wurde in dieser Arbeit der Verlauf der Treg-Zahlen während einer solchen Immuntherapie beobachtet.

Die in dieser Arbeit gezeigten Daten beinhalten jeweils sechs Proben von zwei Patienten im zeitlichen Verlauf einer Vakzinierung, und können demnach nur Tendenzen zeigen. Die erste Messung der Treg erfolgte kurz nach HD-CTX. Dieser Wert zeigte für beide Patienten erhöhte prozentuale Treg-Werte im Vergleich zum medianen Wert für unbehandelte MM-Patienten. Hierbei wies einer der Patienten eine starke, der andere hingegen nur eine schwache Erhöhung auf. Auch für die absoluten Treg-Zahlen zeigte einer der Patienten einen eher niedrigeren der andere einen eher höheren Wert im Vergleich zu unbehandelten Patienten. Dies ist wahrscheinlich auf die individuellen Schwankungen in der Treg Zahl zurückzuführen. Prozentual gehen die Treg-Werte dann bis zum Zeitpunkt V0 zurück. Dies könnte durch den zurückgehenden Effekt einer HD-CTX bzw. G-CSF erklärbar sein. Für die absolute Treg-Zahl war ein erhöhter Treg-Wert kurz nach HD-CTX nur bei einem Patienten zu beobachten. Bei dem anderen blieb der Wert bis zum Zeitpunkt V0 gleich. Während der Vakzinierung wurden an drei Zeitpunkten die Treg-Zahlen gemessen. Sowohl prozentual als auch absolut konnte bei beiden Patienten eine gleichmäßige Erhöhung der Treg-Zahlen von Zeitpunkt V1 zu V2 zu V3 beobachtet werden. Diese Daten korrelieren mit der Arbeit von Banerjee et al. (2006), die eine Erhöhung der Treg durch eine auf dendritischen Zellen basierende Vakzine nachwies. Auch in dieser Arbeit konnte bei beiden Patienten eine Erhöhung der Treg-Zahlen beobachtet werden, die möglicherweise auf die Vakzinierung zurückzuführen ist. Drei Monate nach der letzten Vakzinierung waren die Treg-Werte beider Patienten noch deutlich höher als zum Zeitpunkt V0. Eine weitere Erhöhung der Treg-Zahlen seit V3 konnte aber nur bei einem der Patienten gemessen werden. Bei dem anderen Patienten könnte ein solcher Effekt bereits wieder zurückgegangen sein.

Vergleichend hierzu wurden auch die absoluten CD4⁺- und CD8⁺-Werte zu den oben beschriebenen Zeitpunkten gemessen. Für die CD4⁺-Werte ergaben sich hierbei für einen der Patienten nur leichte Schwankungen kurz nach HD-CTX und während der Vakzinierung. Bei dem anderen Patienten konnte hingegen eine Erhöhung der CD4⁺-Zellen vom Zeitpunkt der HD-CTX bis zur ersten Vakzinierung beobachtet werden. Hierbei handelt es sich möglicherweise um die Rekonstitution nach Chemotherapie. Während der Vakzine zeigten sich auch hier nur leichte Schwankungen. Drei Monate nach Vakzine ist ein Anstieg der CD4⁺-Zellen zu sehen. Dies könnte auf die

Vakzinierung und die damit verbundene Aktivierung von CD4⁺-Zellen zurückzuführen sein. Die Werte für die CD8⁺-Zellen zeigen bei beiden Patienten einen niedrigeren Wert für den Zeitpunkt kurz nach HD-CTX im Gegensatz zum Zeitpunkt V0 und V1. Hier könnte ebenfalls eine Rekonstitution der Zellen nach Chemotherapie zu sehen sein. Während der Vakzinierung (V1-V3) nahmen die CD8⁺-Zellen bei einem Patienten eher ab, bei dem anderen bleiben sie weitestgehend gleich. Auch drei Monate nach Therapie sind die Werte für die zwei Patienten unterschiedlich. Einer zeigt eine Zunahme seit der letzten Vakzinierung, der andere hingegen eine Abnahme. Diese Werte könnten auf die Chemotherapie zurückzuführen sein und die Rekonstitution der CD8⁺-Zellen zeigen. Möglicherweise ist aber auch, zumindest bei einem Patienten, eine Suppression durch die erhöhte Treg-Anzahl zu sehen.

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse zeigten also eine Erhöhung der prozentualen und absoluten Treg-Zahlen, die möglicherweise durch eine Vakzinierung induziert wurden. In der Literatur wird diese Fragestellung bereits diskutiert.

Bereits 1989 fanden Mukherji et al. beim Melanom CD4⁺-Lymphozyten, die eine CD8⁺-T-Zell-Antwort herunterregulierten. Miescher et al. (1987) konnten nachweisen, dass tumorinfiltrierende Lymphozyten aus soliden Tumoren isoliert und expandiert werden können und *In-vitro* eine starke Anti-Tumor-Antwort zeigten. Trotzdem wurde das Tumorwachstum *In-vivo* durch diese Zellen nicht gestoppt. Beide Publikationen zeigten also das Vorhandensein von immunsuppressiven Zellen, die negativ auf die Anti-Tumor-Antwort wirkten. Wang et al. (2004) isolierten schließlich beim Melanom CD4⁺-T-Zellklone, von denen einer CD25, GITR und FOXP3 exprimierte und das Tumorantigen erkannte. Diese Zellen inhibierten eine durch CD3-spezifische Antikörper stimulierte Proliferation von CD4⁺-Zellen. Auch andere Arbeitsgruppen zeigten schließlich eine Suppression der Anti-Tumor-Antwort durch Treg (Curiel et al., 2004; Hansson et al., 2007). Diese Entdeckung war im Hinblick auf die Immuntherapie, im Besonderen die Vakzinierungen beispielsweise durch Id-beladene dendritische Zellen, von Bedeutung. Bislang funktioniert eine solche Therapie noch nicht ohne Probleme (Rosenberg, 2004). Ein Grund hierfür könnte der negative Einfluss von Treg sein. In verschiedenen Arbeiten wurde bereits dargelegt, dass eine Depletion von Treg bei einer Vakzinierung deren Erfolg verbesserte

(Dannull et al., 2005; Ghiringhelli et al., 2004; Ghiringhelli et al., 2007; Phan et al., 2003).

Um die in dieser Promotion gezeigten Einzeldaten zu verifizieren, ist also eine Beobachtung der Treg-Zahlen bei weiteren Patienten im Verlauf einer Immuntherapie notwendig. Diese Arbeit könnte allerdings einen weiteren Hinweis darauf geben, dass sich die bislang unbefriedigenden Ergebnisse von Vakzinierungen eventuell auf die ungewollte Induzierung von Treg zurückführen lassen. In weitergehenden Versuchen wäre besonders die genaue Interaktion der Treg mit den beladenen dendritischen Zellen interessant, um eine geeignete Methode zur Unterdrückung der Treg bei einer Vakzinierung zu finden, durch die der Therapieerfolg eventuell weiter verbessert werden könnte. Eine der neusten Arbeiten zu diesem Thema veröffentlichten Song et al. (2008). Sie konnten in Mausversuchen nachweisen, dass der Zinkfinger A20 eventuell eine Möglichkeit zur Kontrolle der Treg bei einer Vakzinierung sein könnte. DZs, bei denen A20 inaktiviert wurde, konnten Treg inhibieren und gleichzeitig Tumor-infiltrierende zytotoxische T-Zellen und T-Helferzellen aktivieren, die gegen die Suppression durch Treg immun waren. Weitergehende Versuche zu diesem Thema könnten einen wichtigen Beitrag zur Verbesserung der Vakzinierungsergebnisse leisten.

4.2 Treg-Isolierungen, Expansionen und funktionelle Tests

4.2.1 Vergleich verschiedener Treg-Isolierungsmethoden

Um Treg bei MM-Patienten genauer untersuchen zu können, ist es wichtig diese Zellen mit geeigneten Methoden zu isolieren, expandieren und funktionell zu testen. Hierzu wurden in der vorliegenden Arbeit vier Methoden zur Isolierung von Treg (zunächst von normalen Spendern) anhand ihrer Oberflächenmarker CD4⁺ und CD25^{high} getestet und verglichen. Zwei der Methoden basierten hierbei auf der Anwendung magnetischer Beads (Miltenyi, Dynal), eine Methode verwendete ausschließlich ein präparatives Durchflußzytometer und bei einer Methode handelte es sich um eine Kombination dieser beiden Methoden.

Die für Treg-Isolierungen erhältlichen Kits der Firmen Miltenyi und Dynal lassen laut Herstellerangaben eine gute Ausbeute und Reinheit erwarten. Bei der Analyse des ersten Schrittes, der Aufreinigung der CD4⁺-Fraktion, konnte in dieser Arbeit eine

signifikant niedrigere Ausbeute an CD4⁺-Zellen mit dem Kit der Firma Miltenyi im Vergleich zur Methode der Firma Dynal festgestellt werden. Im Bezug auf die Reinheit dieser Fraktion konnten signifikant höhere Werte mit dem Kit der Firma Miltenyi erreicht werden. Der zweite Schritt, die Aufreinigung der Treg, ergab mit beiden Kits nur eine sehr geringe Ausbeute von unter 5% der in der Probe vorhandenen Treg. Hierbei war die Reinheit bei Verwendung des Kits der Firma Dynal signifikant höher.

Denselben Vergleich dieser beiden Isolationskits führte auch die Arbeitsgruppe Oberg (Oberg et al., 2006) durch. Allerdings analysierten sie nicht die in dieser Arbeit so gering ausgefallenen Ausbeuten, sondern verglichen die Reinheiten und suppressiven Eigenschaften der isolierten Zellen. Wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben fanden auch sie eine höhere Reinheit der CD4⁺-Fraktion bei Verwendung des Kits der Firma Miltenyi. Die Reinheit der im zweiten Schritt isolierten Treg zeigte sich bei ihnen jedoch im Gegensatz zu dieser Arbeit bei beiden Kits gleich. Dieser Unterschied könnte durch die in dieser Arbeit verwendeten Säulen bei der Aufreinigung mit dem Kit der Firma Miltenyi bedingt sein. Statt die vom Hersteller vorgesehenen wurden hier teilweise andere Säulen des gleichen Herstellers verwendet, um eine bessere Ausbeute zu erlangen. Wahrscheinlich wurde die Reinheit der mit dem Kit der Firma Miltenyi aufgereinigten Treg dadurch schlechter, ihre Ausbeute hingegen besser. Die Angaben zur Reinheit der mit den beiden hier verwendeten Kits isolierten Treg variieren aber auch in der Literatur. Cosentino et al. (2007), Strauss et al. (2007) und Allan et al. (2007) erreichten in ihren Arbeiten hohe Reinheiten von 95%, >96% und >90% mit den Kits der Firma Miltenyi bzw. Dynal. Hombach et al. (2007) und Wichlan et al. (2006) konnten mit diesen Kits hingegen nur Reinheiten von >80% bzw. 22-74% erreichen. In dieser Arbeit konnten im Vergleich mit dem Kit der Firma Miltenyi eine Reinheit von 43,4% (22-87%) und mit dem Kit der Firma Dynal eine Reinheit von 83,3% (49,3-97,4%) erlangt werden.

Ein weitaus größeres Problem, als die Höhe der Reinheit war in dieser Arbeit allerdings die viel zu geringe Ausbeute bei der Verwendung beider Kits. Hombach et al. (2007) verwendeten bei ihren Versuchen ebenfalls das Kit der Firma Miltenyi mit leichten Modifikationen. Sie berichten, dass sie aus 2×10^8 CD4⁺-Zellen in der Regel $1-3 \times 10^6$ Treg isolieren konnten. Diese Angaben stimmen in etwa mit der Relation der in dieser Arbeit erreichten Ausbeute überein. So konnten in einem beispielhaften Versuch mit Hilfe des Kits der Firma Miltenyi aus $3,89 \times 10^6$ CD4⁺-Zellen 3×10^4 Treg-

Zellen isoliert werden. Die Ausbeute der Treg lag auch in diesem Versuch unter 5% der theoretisch in der mononukleären Zellfraktion vorhandenen Treg. Die Gründe für diese geringen Ausbeuten bleiben unklar. Eine mögliche Erklärung könnte die Verwendung von gefilterten „buffy coats“ sein. Durch diese „buffy coat“-Herstellung werden die Zellen oft schon geschädigt und sterben dann bei einer lang andauernden Isolierung schneller ab. Da in dieser Arbeit aber auch nicht gefilterte „buffy coats“ verwendet wurden, bleibt die Erklärung für die durchgehend schlechten Ausbeuten aber weiter unklar. Auch die Kontaktaufnahmen mit den Herstellern der verwendeten Isolationskits erbrachten keine besseren Ausbeuten. Die Firma Miltenyi konnte auch durch eigenständige Durchführung einer Isolation durch eine Mitarbeiterin das Problem nicht lösen. Die Firma Dynal konnte nur den Hinweis geben, ihr Isolationskit sei für eine sehr große Ausgangszellzahl erstellt, bei kleineren Mengen könne es zu Problemen kommen.

Im zweiten Schritt sollten zwei Methoden verglichen werden, die ein FACS verwenden. Hierzu zählte die Aufreinigung der Treg mit und ohne Voraufreinigung der CD4⁺-Fraktion mittels magnetischer Beads. Beide Methoden wurden bereits mehrfach in der Literatur beschrieben (FACS allein: Baecher-Allan et al., 2005; FACS mit Voraufreinigung: Wang et al., 2007; Karakhanova et al., 2006; Condomines et al., 2006). Die Voraufreinigung sollte hierbei dazu dienen, die FACS-Aufreinigung zeitlich zu verkürzen und eine für die Zellen schonendere Isolierung durchzuführen.

Beim Vergleich der beiden Isolierungs-Methoden konnten in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich der Ausbeute und Reinheit der Treg keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Aufgrund deutlich stärkerer Schwankungen der Ergebnisse für die kombinierte Methode wurde in dieser Arbeit die Methode ohne Voraufreinigung bevorzugt.

Diese Schwankungen der Ergebnisse können möglicherweise auf eine starke Belastung der Zellen zunächst durch die Säulen während der Voraufreinigung und anschließend durch die FACS-Sortierung erklärt werden. Zellen unterschiedlicher Spender scheinen hierauf unterschiedlich stark zu reagieren. Bei ausschließlicher Verwendung eines FACS fehlt die Belastung der Zellen durch die Säulen, wodurch möglicherweise die höhere Überlebensrate der Zellen erklärbar ist.

Abschließend wurden nun die Ergebnisse der Isolierungen unter Verwendung magnetischer Beads bzw. eines FACS verglichen. In der vorliegenden Arbeit wurde die FACS-Aufreinigung bevorzugt, da die Ausbeute bei der Aufreinigung mit Beads zu gering war und die Reinheiten bei beiden Methoden vergleichbar war. Ahn et al. (2007) fanden bei einem solchen Vergleich ähnliche Ergebnisse. Baecher-Allan et al. (2005) isolierten in ihrer Arbeit die CD4⁺-Fraktion mittels magnetischer Beads und verglichen anschließend die Treg-Aufreinigung aus dieser Fraktion durch ein FACS oder magnetische Beads. Bei diesem Vergleich fanden sie eine höhere Treg-Ausbeute durch die Beads, was ihrer Meinung nach auf eine Kontamination der Treg mit CD4⁺CD25^{medium}-Zellen hindeutete. Des Weiteren stellten sie fest, dass die durch Beads isolierten Treg im Gegensatz zu den FACS-isolierten, kaum suppressive Fähigkeiten zeigten. Demnach schien auch hier die FACS-Aufreinigung deutlich besser geeignet zu sein.

Leider ist es jedoch schwierig die in der vorliegenden Arbeit erreichte Ausbeute von im Median 58,15% bei Aufreinigung von Treg mittels eines FACS mit den Angaben in der Literatur zu vergleichen, da hier keine Messungen der Treg vor der Aufreinigung gezeigt werden. Lediglich Baecher-Allan et al. (2005) äußern sich zu ihrer Treg Ausbeute bei einer Aufreinigung mit einem FACS. Aus 1×10^8 mononukleären Zellen konnten sie ca. 1×10^5 Treg isolieren. Vergleicht man diese Angabe mit den in der vorliegenden Arbeit erreichten Ausbeuten, so liegt die in dieser Promotion erreichte Ausbeute höher. Hier konnten in einem beispielhaften Versuch aus $1,4 \times 10^8$ mononukleären Zellen $9,6 \times 10^5$ Treg isoliert werden.

4.3 Expansion von Treg.

Da Treg nur 2-5% der CD4⁺-Fraktion ausmachen, ist es oft aufgrund einer zu geringen Zellzahl nicht möglich, funktionelle Analysen direkt nach der Isolierung anzusetzen. Dieses Problem sollte über eine *In-vitro* Expansion der isolierten Treg gelöst werden. Um Treg expandieren zu können ist es notwendig, die für diese Zellen charakteristische Anergie auf eine unspezifische Stimulierung hin zu brechen. Zunächst wurde versucht die Expansion mittels einer mit CD3-spezifischen Antikörpern beschichteten Mikrotiterplatte und zusätzlich löslichem CD28-spezifischem Antikörper und IL-2 zu erreichen. Unter diesen Bedingungen konnte allerdings keine Expansion der Treg-Zellen nachgewiesen werden, wie auch die Ergebnisse von Hoffmann et al. (2004) bestätigen.

In weiteren Experimenten wurde anschließend der Versuch einer Expansion der Treg mit Hilfe von mit CD3- und CD28-spezifischen Antikörpern beschichteten Beads (Firma Dynal) und Zugabe von hohen Konzentrationen IL-2 unternommen. Nach 11-29 Tagen konnte eine im Median 10fache Expansion der Treg gemessen werden, CD4⁺CD25⁻-Zellen zeigten bei gleichen Bedingungen eine signifikant höhere Expansion (Faktor 23,3).

Diese Ergebnisse wurden von Godfrey et al. (2004), Godfrey et al. (2005) und Hoffmann et al. (2004) unterstützt. Auch sie erreichten eine Expansion der Treg mit Hilfe der beschriebenen Beads.

Möglicherweise hat die Expansion ohne beschichtete Beads nicht funktioniert, weil eine Präsentation von CD3- und CD28-spezifischen Antikörpern durch Zellen bzw. Beads (künstliche Zellen) nötig ist, um eine Treg Expansion zu erlangen.

Nach erfolgreicher Expansion wurde der Phänotyp der expandierten Zellen mittels einer FOXP3-Färbung überprüft. Hierbei zeigte sich, dass die Treg-Fraktion nur zu 9,5% positiv für FOXP3 war. Die unter den gleichen Bedingungen expandierten CD4⁺CD25⁻-Zellen waren zu 2% positiv für FOXP3.

Eine Erklärung für die niedrige FOXP3-Positivität der Treg-Fraktion könnte ein Überwachsen der Treg-Zellen durch CD4⁺CD25^{medium}- oder ^{low}- Zellen sein. Strauss et al. (2007) beschäftigten sich in ihrer Arbeit mit diesem Problem. Sie zeigten, dass mit einer Expansion mit Expanderbeads und IL-2 CD4⁺CD25^{medium}- oder ^{low}- Zellen expandiert werden können. Da diese Zellen schneller proliferieren als Treg könnten sie die Treg überwachsen haben. Möglicherweise war die Reinheit der Treg-Fraktion in dieser Arbeit (72,3%) für eine Expansion zu gering, so dass zu viele als Kontamination in der Zellfraktion verbliebene Zellen durch die Expansion proliferierten. Eine weitere Erklärung für diese Ergebnisse wären technische Probleme bei der intrazellulären Färbung mit FOXP3. Es ist nicht auszuschließen, dass das Permeabilisieren der Zellen aus unbekannten Gründen nicht vollständig war, so dass eine Antikörperbindung nur bedingt stattfinden konnte. Sollte es sich allerdings nicht um ein technisches Artefakt handeln, so wird durch diesen Versuch deutlich, dass für eine Expansion eine Ausgangszellfraktion von Treg mit einer sehr hohen Reinheit zur Verfügung stehen muss, da schon bei einer Reinheit von 72,3% ein Überwachsen der Treg stattfinden kann.

4.4 Suppression der Proliferation von CD4⁺CD25⁻-Zellen durch Treg.

Nach erfolgreicher Expansion bzw., wenn möglich, direkt nach der Isolierung, sollten die Treg-Zellen auf ihre Funktionalität hin überprüft werden. Dabei sollte auch analysiert werden, ob sich eine Expansion negativ auf die suppressiven Fähigkeiten der Treg auswirkt. Die unspezifische Stimulation der Zielzellen erfolgte durch CD3- und CD28-spezifische Antikörper. Auf die Zugabe von IL-2 wurde verzichtet, da dies einen negativen Effekt auf die Suppression haben kann (Oberg et al. 2006).

In der vorliegenden Arbeit konnte für expandierte Treg gezeigt werden, dass die Zellen im Mischungsverhältnis Treg:CD25⁻-Zellen 1:1 gegenüber denen im Mischungsverhältnis Treg:CD25⁻-Zellen 0:2 weniger wachsen. Der Vergleich der Ansätze Treg:CD25⁻-Zellen 1:1 und Treg:CD25⁻-Zellen 0,5:1 ergab hingegen keinen Unterschied.

Auch zuvor nicht expandierte Treg zeigten ein geringeres Wachstum der Zellen in dem Ansatz Treg:CD25⁻-Zellen 1:1 gegenüber denen im Mischungsverhältnis Treg:CD25⁻-Zellen 0:2. Im Vergleich zu expandierten Treg konnte hier sogar ein noch deutlicherer Unterschied beobachtet werden. Zusätzlich konnte hier gezeigt werden, dass Treg-Zellen, wenn sie allein kultiviert wurden, nicht auf die Stimulation reagierten. Die für Treg typische Anergie *In-vitro* auf einen unspezifischen Stimulus hin konnte also nachgewiesen werden. Das Gegenteil war bei einer alleinigen Kultivierung der Ziellzellen der Fall. Sowohl die Treg-Fraktion, als auch die Fraktion der Zielzellen reagierten wie erwartet auf die Stimulierung.

Die hier gezeigten Ergebnisse scheinen also auf einen Unterschied zwischen expandierten und nicht expandierten Treg hinzudeuten. Eine eindeutige Suppression der Proliferation von Zielzellen durch Treg kann allerdings sowohl bei expandierten, als auch bei nicht expandierten Treg nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise ist dies auf technische Probleme zurückzuführen, durch die die Ergebnisse des Tritium-Thymidin-Einbaus stark variierten. Andererseits ist der in dieser Arbeit durchgeführte Suppressionstest bereits so oder in einer leicht abgewandelten Form von den Arbeitsgruppen Pandiyan et al. (2007) und Roncador et al. (2005) erfolgreich durchgeführt worden. Eine andere Form des Suppressionstests, der in der Literatur häufig beschrieben wird, verwendet statt CD3- und CD28-spezifischen Antikörpern bestrahlte APZ (Firan et al., 2006; Nishikawa et al., 2005; Yagi et al., 2004; Sojka et

al., 2005; Seddiki et al., 2006) oder PBMNZ (teilweise wurden T-Zellen depletiert) (Skapenko et al., 2005; Garin et al., 2007; Hoffmann et al., 2004) zur Stimulation der Zielzellen. In der vorliegenden Arbeit wurde auf diese Art der Stimulation verzichtet, da die Anwesenheit bestrahlter Zellen einen zusätzlichen Faktor darstellt, durch den es erschwert wird beobachtete Effekte genau zuzuordnen zu können (Oberg et al., 2006).

Wie bereits erwähnt, geben die oben genannten Ergebnisse einen Hinweis auf eine möglicherweise deutlichere Suppression durch zuvor nicht expandierte Treg. Im Gegensatz zu diesem Ergebnis zeigten Hoffmann et al. (2004) in ihrer Arbeit, dass expandierte Treg dieselben suppressiven Fähigkeiten aufwiesen, wie frisch isolierte Treg. Eine Erklärung für diese Diskrepanz könnte die Reinheit der expandierten Treg-Fraktion sein. Möglicherweise sind durch die Kontamination der Treg-Fraktion in der vorliegenden Arbeit mit CD25^{medium}- und/oder ^{low}- Zellen, die bei der Expansion proliferierten, die Treg überwachsen worden, so dass sich nicht mehr genug Treg in der Fraktion befanden, um eine Suppression eindeutig sichtbar zu machen. Eine unzureichende Reinheit der Treg-Fraktion nach Isolierung könnte auch die stark variierenden Ergebnisse des Tritium-Tymin-Tests bei nicht expandierten Treg erklären. Eine durchschnittliche Reinheit von 72,3% bei der Isolierung könnte zu wenig sein, um eine Suppression eindeutig nachzuweisen. Andererseits konnte für nicht expandierte Treg eindeutig belegt werden, dass sie allein nicht proliferieren, die verwendeten Zielzellen hingegen schon.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass eine *In-vitro* Expansion von Treg mit dem Risiko verbunden ist, ein Überwachsen durch andere Zellen zu begünstigen. Klarere Ergebnisse liefert somit der direkte Suppressionstest. Hierfür ist allerdings eine Isolierung von genügend Zellen mit einer möglichst hohen Reinheit ausschlaggebend. Vergleichende Versuche mit einem anderen Durchflußzytometer oder der automatischen Aufreinigung von Miltenyi (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Abken, Köln) könnten helfen eine höhere Reinheit zu erzielen und die Zellen noch schonender zu isolieren. Die Verwendung von buffy coats scheint generell für Isolierungen nicht gut geeignet zu sein, da die Zellen hier bereits durch die vorangegangene Aufreinigung gestresst sind.

4.5 Ausblick.

Das Multiple Myelom ist eine Krankheit mit noch unbefriedigenden Behandlungsmöglichkeiten. Hoch-Dosis-Chemotherapie und autologe Stammzelltherapie sind bislang die wirksamsten Therapien. In neuester Zeit wird allerdings besonders eine Tumorzell-spezifische Immunität immer wieder als Ansatz für neue Therapien diskutiert. Bei B-Zell-Leukämien bietet besonders das Idiotypprotein eine Möglichkeit für eine Vakzinierung. Die Ergebnisse einer solchen Vakzinierung sind allerdings noch unzureichend, was möglicherweise mit der ungewollten Proliferation von Treg während einer solchen Vakzinierung zusammenhängt. Somit ist die Erforschung von Treg gerade beim Multiplen Myelom von Bedeutung. Durch die Analyse dieser Zellen und eine gezielte Depletion während einer Vakzinierung könnte der Erfolg einer Therapie positiv beeinflusst werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten einen Beitrag dazu leisten die Situation beim Multiplen Myelom im Bezug auf Treg zu verdeutlichen. So konnten besonders Hinweise darauf gesammelt werden, dass eventuell auch die Chemotherapie oder eine Therapie mit G-CSF einen Einfluss auf die Treg-Zahlen hat. Dieses Ergebnis bietet einen Ansatz für weitere Versuche auch bei anderen Krankheitsbildern. Ein weiterer wichtiger Ansatz für die Erforschung der Treg ist eine Methode für eine zuverlässige Isolierung. Dadurch, dass bislang kein Treg spezifischer Marker bekannt ist, ist die Identifizierung dieser Zellen schwierig und führt oft zu unterschiedlichen Ergebnissen in der Literatur. Eine Standardisierung der Treg-Bestimmungen könnte helfen einheitliche Daten zu erhalten und die Schlußfolgerungen zu vereinfachen. Möglicherweise könnte der Nachweis der Marker CD39 und CD73 auf Treg, den Deaglio et al. (2007) erbrachten, dabei helfen die Treg-Identifizierung zu verbessern. Die Verbesserung der Möglichkeiten für die Treg Isolierung würde sich auch positiv auf die *In-vitro* Expansionen und funktionellen Tests auswirken, da das Problem des Überwachsenes der Treg durch CD4⁺CD25^{medium}- oder ^{low}-Zellen dadurch gesenkt werden könnte. Zusammenfassend kann man sagen, dass Treg von medizinischer Relevanz zu sein scheinen und somit Anlass zur weiteren Erforschung dieser Zellen gegeben ist.

5. Zusammenfassung

Treg gewinnen in der Medizin immer mehr an Bedeutung. Insbesondere, da sie einen negativen Einfluss auf das Ergebnis verschiedener Therapieansätze, wie beispielsweise einer Immuntherapie haben können, ist es von großem medizinischem Interesse, diese Population zu erforschen und gegebenenfalls zu manipulieren. In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle der Treg bei MM-Patienten untersucht werden. Hierzu mussten zunächst durchflußzytometrische Protokolle erstellt werden, mit deren Hilfe Treg in Blutproben und Knochenmarkproben identifiziert werden konnten. Die Identifikation der Treg erfolgte hierbei mittels einer Kombination der Treg-spezifischen Oberflächenmarker: CD4⁺, CD25^{high}, CD62L⁺, CTLA-4⁺, CD45RO⁺, CD45RA⁺, CD27⁺ und CD127^{low}. Es ergab sich eine 70,8%ige bis 97,4%ige Positivität für die verwendeten Marker. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die hier untersuchten Treg eher dem „Memory“-Phänotyp als dem naiven Phänotyp entsprachen.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden Blutproben von 11 normalen Spender und 13 Bronchialkarzinompatienten, sowie Blut- und Knochenmarkproben von 42 MM-Patienten miteinander bezüglich der relativen und absoluten Treg-Zahlen verglichen. Die Patienten wurden hierfür in Gruppen eingeteilt, um den Einfluss verschiedener Krankheitsparameter und der Therapie auf die Treg-Zahlen sichtbar zu machen. Die Ergebnisse zeigten nur dann eine erhöhte prozentuale Treg-Zahl im peripheren Blut von MM-Patienten gegenüber normalen Spendern, wenn sowohl therapierte, als auch unbehandelte MM-Patienten in einer Gruppe zusammengefasst wurden, was auf einen möglichen Einfluss der Therapie hindeutet. Die Ergebnisse für den Vergleich von untherapierten Patienten mit CTX-Patienten bestätigten diese Vermutung, da gegenüber den unbehandelten Patienten in den Gruppen mit CTX erhöhte Treg-Frequenzen nachgewiesen werden konnten. Eine Einteilung der Patienten bezüglich verschiedener Krankheitsparameter ergab hingegen keine signifikanten Unterschiede in den Treg-Werten.

Auch die Auswertungen der Treg-Zahlen im Knochenmark zeigten keinen direkten Einfluß der Krankheit auf die Treg-Werte.

Der Vergleich von BK- und MM-Patienten ergab wie erwartet eine signifikant höhere Treg-Frequenz bei BK-Patienten im Vergleich zu normalen Spendern und MM-

Patienten. Die in der Literatur beschriebene Erhöhung der Treg-Frequenz bei soliden Tumoren konnte also bestätigt werden.

Zusätzlich zu den beschriebenen Analysen wurden auch Treg-Zahlen bei zwei Patienten vor, während und nach einer Immuntherapie gemessen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass bei beiden Patienten ein kontinuierlicher Anstieg der prozentualen und absoluten Treg-Zahlen zu sehen ist. Dies weist auf eine Erhöhung der Treg bedingt durch die Immuntherapie hin.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Isolierung, Expansion und mit funktionellen Tests von Treg normaler Spender. Bei der Analyse verschiedener Isoliermethoden, basierend auf magnetischen Beads oder einem FACS, erwies sich diejenige Treg-Aufreinigung als am besten geeignet, die ausschließlich ein FACS verwendet und auf eine Voraufreinigung mittels magnetischer Beads verzichtet. Aufreinigungen durch magnetische Beads ergaben nur sehr geringe Ausbeuten und wurden deshalb als nicht geeignet eingestuft.

Bei *In-vitro*-Expansionen zuvor isolierter Zellen konnte zwar eine Vermehrung der Treg-Fraktion um den Faktor 10 erreicht werden, eine FOXP3-Färbung nach Expansion zeigte allerdings nur eine Positivität der Treg-Fraktion von 9,5%. Somit konnte gezeigt werden, dass eine große Reinheit der Treg-Fraktion von entscheidender Bedeutung für die erfolgreiche Treg-Expansion ist, um die Problematik des Überwachsens durch andere in der Treg-Fraktion verbliebene Zellen zu minimieren. Auch die in dieser Arbeit durchgeführten Suppressionstests zeigten eine deutlichere Suppression durch Treg bei Verwendung von zuvor nicht expandierten Zellen.

Die vorliegende Arbeit gibt demnach Hinweise auf eine Beeinflussung der Treg-Zahlen bei MM-Patienten sowohl durch die Chemotherapie als auch durch die Immuntherapie. Im Gegensatz zu den Ergebnissen für BK-Patienten konnten für MM-Patienten keine Ergebnisse erzielt werden, die auf einen direkten Einfluss der Krankheit auf Treg schließen lassen. Somit wäre eine weitere Analyse der Reaktion der Treg auf verschiedene Therapien von klinischer Bedeutung, da so eine mögliche negative Beeinflussung der Treg auf den Therapieerfolg verhindert werden kann. Des Weiteren könnten die Mechanismen, mit deren Hilfe Treg resistent gegen konventionelle Chemotherapien werden bzw. schneller als andere CD4-positive Zellen rekonstituieren von medizinischer Bedeutung sein.

6. Literatur

Agnello, D., Lankford, C. S., Bream, J., Morinobu, A., Gadina, M., O'shea, J. J. and Frucht, D. M. (2003). "Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights." *J Clin Immunol*; **23** (3): 147-61.

Ahn, J. S., Krishnadas, D. K. and Agrawal, B. (2007). "Dendritic cells partially abrogate the regulatory activity of CD4+CD25+ T cells present in the human peripheral blood." *Int Immunol*; **19** (3): 227-37.

Allan, S. E., Crome, S. Q., Crellin, N. K., Passerini, L., Steiner, T. S., Bacchetta, R., Roncarolo, M. G. and Levings, M. K. (2007). "Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production." *Int Immunol*; **19** (4): 345-54.

Alvaro, T., Lejeune, M., Salvado, M. T., Bosch, R., Garcia, J. F., Jaen, J., Banham, A. H., Roncador, G., Montalban, C. and Piris, M. A. (2005). "Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells." *Clin Cancer Res*; **11** (4): 1467-73.

Anderson, C. F., Oukka, M., Kuchroo, V. J. and Sacks, D. (2007). "CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis." *J Exp Med*; **204** (2): 285-97.

Anderson, K. C., Kyle, R. A., Dalton, W. S., Landowski, T., Shain, K., Jove, R., Hazlehurst, L. and Berenson, J. (2000). "Multiple Myeloma: New Insights and Therapeutic Approaches." *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 147-165.

Antonchuk, J., Sauvageau, G. and Humphries, R. K. (2001). "HOXB4 overexpression mediates very rapid stem cell regeneration and competitive hematopoietic repopulation." *Exp Hematol*; **29** (9): 1125-34.

Apostolou, I. and Von Boehmer, H. (2004). "In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells." *J Exp Med*; **199** (10): 1401-8.

Arstila, T. P., Casrouge, A., Baron, V., Even, J., Kanellopoulos, J. and Kourilsky, P. (1999). "A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity." *Science*; **286** (5441): 958-61.

Atanackovic, D., Cao, Y., Luetkens, T., Panse, J., Faltz, C., Arfsten, J., Bartels, K., Wolschke, C., Eiermann, T., Zander, A. R., Fehse, B., Bokemeyer, C. and Kroger, N. (2008). "CD4+CD25+FOXP3+ T regulatory cells reconstitute and accumulate in the bone marrow of patients with multiple myeloma following allogeneic stem cell transplantation." *Haematologica*; **93** (3): 423-30.

Baecher-Allan, C., Brown, J. A., Freeman, G. J. and Hafler, D. A. (2001). "CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood." *J Immunol*; **167** (3): 1245-53.

- Baecher-Allan, C., Wolf, E. and Hafler, D. A. (2005). "Functional analysis of highly defined, FACS-isolated populations of human regulatory CD4⁺ CD25⁺ T cells." *Clin Immunol*; **115** (1): 10-8.
- Banerjee, D. K., Dhodapkar, M. V., Matayeva, E., Steinman, R. M. and Dhodapkar, K. M. (2006). "Expansion of FOXP3^{high} regulatory T cells by human dendritic cells (DCs) in vitro and after injection of cytokine-matured DCs in myeloma patients." *Blood*; **108** (8): 2655-61.
- Banham, A. H., Powrie, F. M. and Suri-Payer, E. (2006). "FOXP3⁺ regulatory T cells: Current controversies and future perspectives." *Eur J Immunol*; **36** (11): 2832-6.
- Bataille, R. and Harousseau, J. L. (1997). "Multiple myeloma." *N Engl J Med*; **336** (23): 1657-64.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., Weiner, H. L. and Kuchroo, V. K. (2006). "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells." *Nature*; **441** (7090): 235-8.
- Beyer, M., Kochanek, M., Darabi, K., Popov, A., Jensen, M., Endl, E., Knolle, P. A., Thomas, R. K., Von Bergwelt-Baildon, M., Debey, S., Hallek, M. and Schultze, J. L. (2005). "Reduced frequencies and suppressive function of CD4⁺CD25^{hi} regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine." *Blood*; **106** (6): 2018-25.
- Beyer, M., Kochanek, M., Giese, T., Endl, E., Weihrauch, M. R., Knolle, P. A., Classen, S. and Schultze, J. L. (2006). "In vivo peripheral expansion of naive CD4⁺CD25^{high} FoxP3⁺ regulatory T cells in patients with multiple myeloma." *Blood*; **107** (10): 3940-9.
- Bianchi, A., Mariani, S., Beggiato, E., Borriore, P., Peola, S., Boccadoro, M., Pileri, A. and Massaia, M. (1997). "Distribution of T-cell signalling molecules in human myeloma." *Br J Haematol*; **97** (4): 815-20.
- Bodor, J., Bodorova, J. and Gress, R. E. (2000). "Suppression of T cell function: a potential role for transcriptional repressor ICER." *J Leukoc Biol*; **67** (6): 774-9.
- Bodor, J., Fehervari, Z., Diamond, B. and Sakaguchi, S. (2007). "ICER/CREM-mediated transcriptional attenuation of IL-2 and its role in suppression by regulatory T cells." *Eur J Immunol*; **37** (4): 884-95.
- Bommhardt, U., Beyer, M., Hunig, T. and Reichardt, H. M. (2004). "Molecular and cellular mechanisms of T cell development." *Cell Mol Life Sci*; **61** (3): 263-80.
- Bopp, T., Becker, C., Klein, M., Klein-Hessling, S., Palmetshofer, A., Serfling, E., Heib, V., Becker, M., Kubach, J., Schmitt, S., Stoll, S., Schild, H., Staeger, M. S., Stassen, M., Jonuleit, H. and Schmitt, E. (2007). "Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression." *J Exp Med*; **204** (6): 1303-10.

Braunwald, E., Fauci, A. S., Kasper, D. L., Hauser, S. L., Longo, D. L. and Jameson, J. L. (2001). *Harrison's Principles of Internal Medicine*, Mc Graw Hill.

Brimnes, M. K., Svane, I. M. and Johnsen, H. E. (2006). "Impaired functionality and phenotypic profile of dendritic cells from patients with multiple myeloma." *Clin Exp Immunol*; **144** (1): 76-84.

Brown, R., Murray, A., Pope, B., Sze, D. M., Gibson, J., Ho, P. J., Hart, D. and Joshua, D. (2004). "Either interleukin-12 or interferon-gamma can correct the dendritic cell defect induced by transforming growth factor beta in patients with myeloma." *Br J Haematol*; **125** (6): 743-8.

Brown, R. D., Pope, B., Yuen, E., Gibson, J. and Joshua, D. E. (1998). "The expression of T cell related costimulatory molecules in multiple myeloma." *Leuk Lymphoma*; **31** (3-4): 379-84.

Calvi, L. M., Adams, G. B., Weibrecht, K. W., Weber, J. M., Olson, D. P., Knight, M. C., Martin, R. P., Schipani, E., Divieti, P., Bringham, F. R., Milner, L. A., Kronenberg, H. M. and Scadden, D. T. (2003). "Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche." *Nature*; **425** (6960): 841-6.

Cao, X., Cai, S. F., Fehniger, T. A., Song, J., Collins, L. I., Piwnica-Worms, D. R. and Ley, T. J. (2007). "Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance." *Immunity*; **27** (4): 635-46.

Carreras, J., Lopez-Guillermo, A., Fox, B. C., Colomo, L., Martinez, A., Roncador, G., Montserrat, E., Campo, E. and Banham, A. H. (2006). "High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma." *Blood*; **108** (9): 2957-64.

Chattopadhyay, S., Mehrotra, S., Chhabra, A., Hegde, U., Mukherji, B. and Chakraborty, N. G. (2006). "Effect of CD4+CD25+ and CD4+CD25- T regulatory cells on the generation of cytolytic T cell response to a self but human tumor-associated epitope in vitro." *J Immunol*; **176** (2): 984-90.

Chen, L. (2004). "Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity." *Nat Rev Immunol*; **4** (5): 336-47.

Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K. J., Li, L., Marinos, N., Mcgrady, G. and Wahl, S. M. (2003). "Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3." *J Exp Med*; **198** (12): 1875-86.

Collison, L. W., Workman, C. J., Kuo, T. T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K. M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R. S. and Vignali, D. A. (2007). "The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function." *Nature*; **450** (7169): 566-9.

Condomines, M., Quittet, P., Lu, Z. Y., Nadal, L., Latry, P., Lopez, E., Baudard, M., Requirand, G., Duperray, C., Schved, J. F., Rossi, J. F., Tarte, K. and Klein, B. (2006). "Functional regulatory T cells are collected in stem cell autografts by

mobilization with high-dose cyclophosphamide and granulocyte colony-stimulating factor." *J Immunol*; **176** (11): 6631-9.

Coombes, J. L., Robinson, N. J., Maloy, K. J., Uhlig, H. H. and Powrie, F. (2005). "Regulatory T cells and intestinal homeostasis." *Immunol Rev*; **204**: 184-94.

Cosentino, M., Fietta, A. M., Ferrari, M., Rasini, E., Bombelli, R., Carcano, E., Saporiti, F., Meloni, F., Marino, F. and Lecchini, S. (2007). "Human CD4+CD25+ regulatory T cells selectively express tyrosine hydroxylase and contain endogenous catecholamines subserving an autocrine/paracrine inhibitory functional loop." *Blood*; **109** (2): 632-42.

Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J. R., Zhang, L., Burow, M., Zhu, Y., Wei, S., Kryczek, I., Daniel, B., Gordon, A., Myers, L., Lackner, A., Disis, M. L., Knutson, K. L., Chen, L. and Zou, W. (2004). "Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival." *Nat Med*; **10** (9): 942-9.

Curiel, T. J., Wei, S., Dong, H., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Krzysiek, R., Knutson, K. L., Daniel, B., Zimmermann, M. C., David, O., Burow, M., Gordon, A., Dhurandhar, N., Myers, L., Berggren, R., Hemminki, A., Alvarez, R. D., Emilie, D., Curiel, D. T., Chen, L. and Zou, W. (2003). "Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity." *Nat Med*; **9** (5): 562-7.

Dannull, J., Su, Z., Rizzieri, D., Yang, B. K., Coleman, D., Yancey, D., Zhang, A., Dahm, P., Chao, N., Gilboa, E. and Vieweg, J. (2005). "Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells." *J Clin Invest*; **115** (12): 3623-33.

De La Rosa, M., Rutz, S., Dorninger, H. and Scheffold, A. (2004). "Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function." *Eur J Immunol*; **34** (9): 2480-8.

Deaglio, S., Dwyer, K. M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J. F., Enjoji, K., Linden, J., Oukka, M., Kuchroo, V. K., Strom, T. B. and Robson, S. C. (2007). "Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression." *J Exp Med*; **204** (6): 1257-65.

Delves, P. J. and Roitt, I. M. (2000a). "The immune system. First of two parts." *N Engl J Med*; **343** (1): 37-49.

Delves, P. J. and Roitt, I. M. (2000b). "The immune system. Second of two parts." *N Engl J Med*; **343** (2): 108-17.

Dimopoulos, M., Spencer, A., Attal, M., Prince, H. M., Harousseau, J. L., Dmoszynska, A., San Miguel, J., Hellmann, A., Facon, T., Foa, R., Corso, A., Masliak, Z., Olesnyckyj, M., Yu, Z., Patin, J., Zeldis, J. B. and Knight, R. D. (2007). "Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed or refractory multiple myeloma." *N Engl J Med*; **357** (21): 2123-32.

Durie, B. G. (2001). "Multiple myeloma: what's new." *CA Cancer J Clin*; **51** (5): 271-2, 263.

Durie, B. G. and Salmon, S. E. (1975). "A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival." *Cancer*, **36** (3): 842-54.

Earle, K. E., Tang, Q., Zhou, X., Liu, W., Zhu, S., Bonyhadi, M. L. and Bluestone, J. A. (2005). "In vitro expanded human CD4+CD25+ regulatory T cells suppress effector T cell proliferation." *Clin Immunol*, **115** (1): 3-9.

Elpek, K. G., Yolcu, E. S., Franke, D. D., Lacelle, C., Schabowsky, R. H. and Shirwan, H. (2007). "Ex vivo expansion of CD4+CD25+FoxP3+ T regulatory cells based on synergy between IL-2 and 4-1BB signaling." *J Immunol*, **179** (11): 7295-304.

Ermann, J., Hoffmann, P., Edinger, M., Dutt, S., Blankenberg, F. G., Higgins, J. P., Negrin, R. S., Fathman, C. G. and Strober, S. (2005). "Only the CD62L+ subpopulation of CD4+CD25+ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD." *Blood*, **105** (5): 2220-6.

Facon, T., Mary, J. Y., Hulin, C., Benboubker, L., Attal, M., Pegourie, B., Renaud, M., Harousseau, J. L., Guillermin, G., Chateix, C., Dib, M., Voillat, L., Maisonneuve, H., Troncy, J., Dorvaux, V., Monconduit, M., Martin, C., Casassus, P., Jaubert, J., Jardel, H., Doyen, C., Kolb, B., Anglaret, B., Grosbois, B., Yakoub-Agha, I., Mathiot, C. and Avet-Loiseau, H. (2007). "Melphalan and prednisone plus thalidomide versus melphalan and prednisone alone or reduced-intensity autologous stem cell transplantation in elderly patients with multiple myeloma (IFM 99-06): a randomised trial." *Lancet*, **370** (9594): 1209-18.

Feyler, S., Von Lilienfeld-Toal, M., Jarmin, S., Marles, L., Rawstron, A., Ashcroft, A. J., Owen, R. G., Selby, P. J. and Cook, G. (2009). "CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells are increased whilst CD3(+)CD4(-)CD8(-)alpha-betaTCR(+) Double Negative T cells are decreased in the peripheral blood of patients with multiple myeloma which correlates with disease burden." *Br J Haematol*, **144** (5): 686-95.

Fiore, F., Nuschak, B., Peola, S., Mariani, S., Muraro, M., Foglietta, M., Coscia, M., Bruno, B., Boccadoro, M. and Massaia, M. (2005). "Exposure to myeloma cell lysates affects the immune competence of dendritic cells and favors the induction of Tr1-like regulatory T cells." *Eur J Immunol*, **35** (4): 1155-63.

Firan, M., Dhillon, S., Estess, P. and Siegelman, M. H. (2006). "Suppressor activity and potency among regulatory T cells is discriminated by functionally active CD44." *Blood*, **107** (2): 619-27.

Fisson, S., Darrasse-Jeze, G., Litvinova, E., Septier, F., Klatzmann, D., Liblau, R. and Salomon, B. L. (2003). "Continuous activation of autoreactive CD4+ CD25+ regulatory T cells in the steady state." *J Exp Med*, **198** (5): 737-46.

Fontenot, J. D., Rasmussen, J. P., Williams, L. M., Dooley, J. L., Farr, A. G. and Rudensky, A. Y. (2005a). "Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3." *Immunity*, **22** (3): 329-41.

Fontenot, J. D. and Rudensky, A. Y. (2005b). "A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3." *Nat Immunol*; **6** (4): 331-7.

Fozza, C., Nadal, E., Longinotti, M. and Dazzi, F. (2007). "T-cell receptor repertoire usage after allografting differs between CD4+CD25+ regulatory T cells and their CD4+CD25- counterpart." *Haematologica*; **92** (2): 206-14.

Fraser, J. D., Irving, B. A., Crabtree, G. R. and Weiss, A. (1991). "Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28." *Science*; **251** (4991): 313-6.

Frassanito, M. A., Cusmai, A. and Dammacco, F. (2001). "Deregulated cytokine network and defective Th1 immune response in multiple myeloma." *Clin Exp Immunol*; **125** (2): 190-7.

Fuchs, E., Tumber, T. and Guasch, G. (2004). "Socializing with the neighbors: stem cells and their niche." *Cell*; **116** (6): 769-78.

Garin, M. I., Chu, C. C., Golshayan, D., Cernuda-Morollon, E., Wait, R. and Lechler, R. I. (2007). "Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells." *Blood*; **109** (5): 2058-65.

Gavin, M. A., Torgerson, T. R., Houston, E., Deroos, P., Ho, W. Y., Stray-Pedersen, A., Ocheltree, E. L., Greenberg, P. D., Ochs, H. D. and Rudensky, A. Y. (2006). "Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development." *Proc Natl Acad Sci U S A*; **103** (17): 6659-64.

Ghiringhelli, F., Larmonier, N., Schmitt, E., Parcellier, A., Cathelin, D., Garrido, C., Chauffert, B., Solary, E., Bonnotte, B. and Martin, F. (2004). "CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative." *Eur J Immunol*; **34** (2): 336-44.

Ghiringhelli, F., Menard, C., Puig, P. E., Ladoire, S., Roux, S., Martin, F., Solary, E., Le Cesne, A., Zitvogel, L. and Chauffert, B. (2007). "Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients." *Cancer Immunol Immunother*; **56** (5): 641-8.

Godfrey, W. R., Ge, Y. G., Spoden, D. J., Levine, B. L., June, C. H., Blazar, B. R. and Porter, S. B. (2004). "In vitro-expanded human CD4(+)CD25(+) T-regulatory cells can markedly inhibit allogeneic dendritic cell-stimulated MLR cultures." *Blood*; **104** (2): 453-61.

Godfrey, W. R., Spoden, D. J., Ge, Y. G., Baker, S. R., Liu, B., Levine, B. L., June, C. H., Blazar, B. R. and Porter, S. B. (2005). "Cord blood CD4(+)CD25(+)-derived T regulatory cell lines express FoxP3 protein and manifest potent suppressor function." *Blood*; **105** (2): 750-8.

Gonen-Gross, T., Achdout, H., Arnon, T. I., Gazit, R., Stern, N., Horejsi, V., Goldman-Wohl, D., Yagel, S. and Mandelboim, O. (2005). "The CD85J/leukocyte inhibitory

receptor-1 distinguishes between conformed and beta 2-microglobulin-free HLA-G molecules." *J Immunol*; **175** (8): 4866-74.

Hansson, L., Abdalla, A. O., Moshfegh, A., Choudhury, A., Rabbani, H., Nilsson, B., Osterborg, A. and Mellstedt, H. (2007). "Long-term idiotype vaccination combined with interleukin-12 (IL-12), or IL-12 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor, in early-stage multiple myeloma patients." *Clin Cancer Res*; **13** (5): 1503-10.

Harding, F. A., McArthur, J. G., Gross, J. A., Raulet, D. H. and Allison, J. P. (1992). "CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones." *Nature*; **356** (6370): 607-9.

Harrison, S. J. and Cook, G. (2005). "Immunotherapy in multiple myeloma--possibility or probability?" *Br J Haematol*; **130** (3): 344-62.

Hartigan-O'Connor, D. J., Poon, C., Sinclair, E. and Mccune, J. M. (2007). "Human CD4+ regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127), allowing consistent identification and sorting of live cells." *J Immunol Methods*; **319** (1-2): 41-52.

Hawrylowicz, C. M. and O'garra, A. (2005). "Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma." *Nat Rev Immunol*; **5** (4): 271-83.

Hoffmann, P., Eder, R., Kunz-Schughart, L. A., Andreesen, R. and Edinger, M. (2004). "Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4(+)CD25high regulatory T cells." *Blood*; **104** (3): 895-903.

Hombach, A. A., Kofler, D., Hombach, A., Rappl, G. and Abken, H. (2007). "Effective proliferation of human regulatory T cells requires a strong costimulatory CD28 signal that cannot be substituted by IL-2." *J Immunol*; **179** (11): 7924-31.

Hori, S., Nomura, T. and Sakaguchi, S. (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." *Science*; **299** (5609): 1057-61.

Huang, S., Apasov, S., Koshiba, M. and Sitkovsky, M. (1997). "Role of A2a extracellular adenosine receptor-mediated signaling in adenosine-mediated inhibition of T-cell activation and expansion." *Blood*; **90** (4): 1600-10.

Huang, Y. H., Zozulya, A. L., Weidenfeller, C., Schwab, N. and Wiendl, H. (2009). "T cell suppression by naturally occurring HLA-G-expressing regulatory CD4+ T cells is IL-10-dependent and reversible." *J Leukoc Biol*; **86** (2): 273-81.

Ibrahim, E. C., Guerra, N., Lacombe, M. J., Angevin, E., Chouaib, S., Carosella, E. D., Caignard, A. and Paul, P. (2001). "Tumor-specific up-regulation of the nonclassical class I HLA-G antigen expression in renal carcinoma." *Cancer Res*; **61** (18): 6838-45.

Ichihara, F., Kono, K., Takahashi, A., Kawaida, H., Sugai, H. and Fujii, H. (2003). "Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers." *Clin Cancer Res*; **9** (12): 4404-8.

Infante-Duarte, C., Horton, H. F., Byrne, M. C. and Kamradt, T. (2000). "Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells." *J Immunol*; **165** (11): 6107-15.

Itoh, M., Takahashi, T., Sakaguchi, N., Kuniyasu, Y., Shimizu, J., Otsuka, F. and Sakaguchi, S. (1999). "Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance." *J Immunol*; **162** (9): 5317-26.

Jankovic, D., Kullberg, M. C., Feng, C. G., Goldszmid, R. S., Collazo, C. M., Wilson, M., Wynn, T. A., Kamanaka, M., Flavell, R. A. and Sher, A. (2007). "Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection." *J Exp Med*; **204** (2): 273-83.

Javia, L. R. and Rosenberg, S. A. (2003). "CD4+CD25+ suppressor lymphocytes in the circulation of patients immunized against melanoma antigens." *J Immunother*; **26** (1): 85-93.

Joetham, A., Takeda, K., Taube, C., Miyahara, N., Matsubara, S., Koya, T., Rha, Y. H., Dakhama, A. and Gelfand, E. W. (2007). "Naturally occurring lung CD4(+)CD25(+) T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF-beta." *J Immunol*; **178** (3): 1433-42.

Jonuleit, H., Schmitt, E., Kakirman, H., Stassen, M., Knop, J. and Enk, A. H. (2002). "Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells." *J Exp Med*; **196** (2): 255-60.

Jonuleit, H., Schmitt, E., Stassen, M., Tuettenberg, A., Knop, J. and Enk, A. H. (2001). "Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood." *J Exp Med*; **193** (11): 1285-94.

Kappler, J. W., Roehm, N. and Marrack, P. (1987). "T cell tolerance by clonal elimination in the thymus." *Cell*; **49** (2): 273-80.

Karakhanova, S., Munder, M., Schneider, M., Bonyhadi, M., Ho, A. D. and Goerner, M. (2006). "Highly efficient expansion of human CD4+CD25+ regulatory T cells for cellular immunotherapy in patients with graft-versus-host disease." *J Immunother*; **29** (3): 336-49.

Kay, N. E., Leong, T., Bone, N., Kyle, R. A., Greipp, P. R., Van Ness, B. and Oken, M. M. (1998). "T-helper phenotypes in the blood of myeloma patients on ECOG phase III trials E9486/E3A93." *Br J Haematol*; **100** (3): 459-63.

Kay, N. E., Leong, T., Kyle, R. A., Greipp, P., Billadeau, D., Van Ness, B., Bone, N. and Oken, M. M. (1997). "Circulating blood B cells in multiple myeloma: analysis and relationship to circulating clonal cells and clinical parameters in a cohort of patients entered on the Eastern Cooperative Oncology Group phase III E9486 clinical trial." *Blood*; **90** (1): 340-5.

- Kay, N. E., Leong, T. L., Bone, N., Vesole, D. H., Greipp, P. R., Van Ness, B., Oken, M. M. and Kyle, R. A. (2001). "Blood levels of immune cells predict survival in myeloma patients: results of an Eastern Cooperative Oncology Group phase 3 trial for newly diagnosed multiple myeloma patients." *Blood*; **98** (1): 23-8.
- Klump, H., Schiedlmeier, B. and Baum, C. (2005). "Control of self-renewal and differentiation of hematopoietic stem cells: HOXB4 on the threshold." *Ann N Y Acad Sci*; **1044**: 6-15.
- Koenen, H. J., Fasse, E. and Joosten, I. (2005). "CD27/CFSE-based ex vivo selection of highly suppressive alloantigen-specific human regulatory T cells." *J Immunol*; **174** (12): 7573-83.
- Kono, K., Kawaida, H., Takahashi, A., Sugai, H., Mimura, K., Miyagawa, N., Omata, H. and Fujii, H. (2006). "CD4(+)CD25high regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers." *Cancer Immunol Immunother*; **55** (9): 1064-71.
- Kreijveld, E., Koenen, H. J., Hilbrands, L. B. and Joosten, I. (2006). "Ex vivo expansion of human CD4+ CD25high regulatory T cells from transplant recipients permits functional analysis of small blood samples." *J Immunol Methods*; **314** (1-2): 103-13.
- Kretschmer, K., Apostolou, I., Hawiger, D., Khazaie, K., Nussenzweig, M. C. and Von Boehmer, H. (2005). "Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen." *Nat Immunol*; **6** (12): 1219-27.
- Kuehl, W. M. and Bergsagel, P. L. (2002). "Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions." *Nat Rev Cancer*; **2** (3): 175-87.
- Kurooka, M. and Kaneda, Y. (2007). "Inactivated Sendai virus particles eradicate tumors by inducing immune responses through blocking regulatory T cells." *Cancer Res*; **67** (1): 227-36.
- Kursar, M., Koch, M., Mittrucker, H. W., Nouailles, G., Bonhagen, K., Kamradt, T. and Kaufmann, S. H. (2007). "Cutting Edge: Regulatory T cells prevent efficient clearance of Mycobacterium tuberculosis." *J Immunol*; **178** (5): 2661-5.
- Landis, S. H., Murray, T., Bolden, S. and Wingo, P. A. (1999). "Cancer statistics, 1999." *CA Cancer J Clin*; **49** (1): 8-31, 1.
- Li, H., Yu, J. P., Cao, S., Wei, F., Zhang, P., An, X. M., Huang, Z. T. and Ren, X. B. (2007). "CD4 +CD25 + regulatory T cells decreased the antitumor activity of cytokine-induced killer (CIK) cells of lung cancer patients." *J Clin Immunol*; **27** (3): 317-26.
- Li, M. O., Sanjabi, S. and Flavell, R. A. (2006). "Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms." *Immunity*; **25** (3): 455-71.
- Liang, S. C., Tan, X. Y., Luxenberg, D. P., Karim, R., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M. and Fouser, L. A. (2006). "Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed

by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides." *J Exp Med*; **203** (10): 2271-9.

Liyanage, U. K., Moore, T. T., Joo, H. G., Tanaka, Y., Herrmann, V., Doherty, G., Drebin, J. A., Strasberg, S. M., Eberlein, T. J., Goedegebuure, P. S. and Linehan, D. C. (2002). "Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma." *J Immunol*; **169** (5): 2756-61.

Lohr, J., Knoechel, B., Wang, J. J., Villarino, A. V. and Abbas, A. K. (2006). "Role of IL-17 and regulatory T lymphocytes in a systemic autoimmune disease." *J Exp Med*; **203** (13): 2785-91.

Longhi, M. S., Hussain, M. J., Mitry, R. R., Arora, S. K., Mieli-Vergani, G., Vergani, D. and Ma, Y. (2006). "Functional study of CD4+CD25+ regulatory T cells in health and autoimmune hepatitis." *J Immunol*; **176** (7): 4484-91.

Lopes, J. E., Torgerson, T. R., Schubert, L. A., Anover, S. D., Ocheltree, E. L., Ochs, H. D. and Ziegler, S. F. (2006). "Analysis of FOXP3 reveals multiple domains required for its function as a transcriptional repressor." *J Immunol*; **177** (5): 3133-42.

Loser, K., Apelt, J., Voskort, M., Mohaupt, M., Balkow, S., Schwarz, T., Grabbe, S. and Beissert, S. (2007). "IL-10 controls ultraviolet-induced carcinogenesis in mice." *J Immunol*; **179** (1): 365-71.

Ludwig, H. (2005). "Advances in biology and treatment of multiple myeloma." *Ann Oncol*; **16 Suppl 2**: ii106-12.

Mahic, M., Yaqub, S., Johansson, C. C., Tasken, K. and Aandahl, E. M. (2006). "FOXP3+CD4+CD25+ adaptive regulatory T cells express cyclooxygenase-2 and suppress effector T cells by a prostaglandin E2-dependent mechanism." *J Immunol*; **177** (1): 246-54.

Mangan, P. R., Harrington, L. E., O'quinn, D. B., Helms, W. S., Bullard, D. C., Elson, C. O., Hatton, R. D., Wahl, S. M., Schoeb, T. R. and Weaver, C. T. (2006). "Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage." *Nature*; **441** (7090): 231-4.

Mantel, P. Y., Ouaked, N., Ruckert, B., Karagiannidis, C., Welz, R., Blaser, K. and Schmidt-Weber, C. B. (2006). "Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells." *J Immunol*; **176** (6): 3593-602.

Marshall, N. A., Christie, L. E., Munro, L. R., Culligan, D. J., Johnston, P. W., Barker, R. N. and Vickers, M. A. (2004). "Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma." *Blood*; **103** (5): 1755-62.

Miescher, S., Whiteside, T. L., Moretta, L. and Von Flidner, V. (1987). "Clonal and frequency analyses of tumor-infiltrating T lymphocytes from human solid tumors." *J Immunol*; **138** (11): 4004-11.

Mills, K. H. and Cawley, J. C. (1983). "Abnormal monoclonal antibody-defined helper/suppressor T-cell subpopulations in multiple myeloma: relationship to treatment and clinical stage." *Br J Haematol*; **53** (2): 271-5.

Mittal, S., Marshall, N. A., Duncan, L., Culligan, D. J., Barker, R. N. and Vickers, M. A. (2008). "Local and systemic induction of CD4+CD25+ regulatory T-cell population by non-Hodgkin lymphoma." *Blood*; **111** (11): 5359-70.

Morgan, M. E., Van Bilsen, J. H., Bakker, A. M., Heemskerk, B., Schilham, M. W., Hartgers, F. C., Elferink, B. G., Van Der Zanden, L., De Vries, R. R., Huizinga, T. W., Ottenhoff, T. H. and Toes, R. E. (2005). "Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans." *Hum Immunol*; **66** (1): 13-20.

Mosmann, T. R. and Coffman, R. L. (1989). "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." *Annu Rev Immunol*; **7**: 145-73.

Motta, M., Rassenti, L., Shelvin, B. J., Lerner, S., Kipps, T. J., Keating, M. J. and Wierda, W. G. (2005). "Increased expression of CD152 (CTLA-4) by normal T lymphocytes in untreated patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia." *Leukemia*; **19** (10): 1788-93.

Mueller, B. U., Pabst, T., Osato, M., Asou, N., Johansen, L. M., Minden, M. D., Behre, G., Hiddemann, W., Ito, Y. and Tenen, D. G. (2002). "Heterozygous PU.1 mutations are associated with acute myeloid leukemia." *Blood*; **100** (3): 998-1007.

Mukherji, B., Guha, A., Chakraborty, N. G., Sivanandham, M., Nashed, A. L., Sporn, J. R. and Ergin, M. T. (1989). "Clonal analysis of cytotoxic and regulatory T cell responses against human melanoma." *J Exp Med*; **169** (6): 1961-76.

Nakamura, K., Kitani, A. and Strober, W. (2001). "Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta." *J Exp Med*; **194** (5): 629-44.

Nikolich-Zugich, J., Slifka, M. K. and Messaoudi, I. (2004). "The many important facets of T-cell repertoire diversity." *Nat Rev Immunol*; **4** (2): 123-32.

Nishikawa, H., Kato, T., Tawara, I., Ikeda, H., Kuribayashi, K., Allen, P. M., Schreiber, R. D., Old, L. J. and Shiku, H. (2005). "IFN-gamma controls the generation/activation of CD4+ CD25+ regulatory T cells in antitumor immune response." *J Immunol*; **175** (7): 4433-40.

Novak, T. J. and Rothenberg, E. V. (1990). "cAMP inhibits induction of interleukin 2 but not of interleukin 4 in T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A*; **87** (23): 9353-7.

Oberg, H. H., Wesch, D., Lenke, J. and Kabelitz, D. (2006). "An optimized method for the functional analysis of human regulatory T cells." *Scand J Immunol*; **64** (3): 353-60.

Oberle, N., Eberhardt, N., Falk, C. S., Krammer, P. H. and Suri-Payer, E. (2007). "Rapid suppression of cytokine transcription in human CD4+CD25 T cells by

CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells: independence of IL-2 consumption, TGF- β , and various inhibitors of TCR signaling." *J Immunol*; **179** (6): 3578-87.

Oderup, C., Cederbom, L., Makowska, A., Cilio, C. M. and Ivars, F. (2006). "Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4⁺ CD25⁺ regulatory T-cell-mediated suppression." *Immunology*; **118** (2): 240-9.

Ogawara, H., Handa, H., Yamazaki, T., Toda, T., Yoshida, K., Nishimoto, N., Al-Ma'quol, W. H., Kaneko, Y., Matsushima, T., Tsukamoto, N., Nojima, Y., Matsumoto, M., Sawamura, M. and Murakami, H. (2005). "High Th1/Th2 ratio in patients with multiple myeloma." *Leuk Res*; **29** (2): 135-40.

Ohishi, K., Varnum-Finney, B. and Bernstein, I. D. (2002). "The notch pathway: modulation of cell fate decisions in hematopoiesis." *Int J Hematol*; **75** (5): 449-59.

Okita, R., Saeki, T., Takashima, S., Yamaguchi, Y. and Toge, T. (2005). "CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with breast cancer and non-small cell lung cancer." *Oncol Rep*; **14** (5): 1269-73.

Ormandy, L. A., Hillemann, T., Wedemeyer, H., Manns, M. P., Greten, T. F. and Korangy, F. (2005). "Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma." *Cancer Res*; **65** (6): 2457-64.

Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J. and Lenardo, M. J. (2007). "CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4⁺ T cells." *Nat Immunol*; **8** (12): 1353-62.

Paust, S., Lu, L., Mccarty, N. and Cantor, H. (2004). "Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease." *Proc Natl Acad Sci U S A*; **101** (28): 10398-403.

Penna, G., Roncari, A., Amuchastegui, S., Daniel, K. C., Berti, E., Colonna, M. and Adorini, L. (2005). "Expression of the inhibitory receptor ILT3 on dendritic cells is dispensable for induction of CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3." *Blood*; **106** (10): 3490-7.

Phan, G. Q., Yang, J. C., Sherry, R. M., Hwu, P., Topalian, S. L., Schwartzentruber, D. J., Restifo, N. P., Haworth, L. R., Seipp, C. A., Freezer, L. J., Morton, K. E., Mavroukakis, S. A., Duray, P. H., Steinberg, S. M., Allison, J. P., Davis, T. A. and Rosenberg, S. A. (2003). "Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma." *Proc Natl Acad Sci U S A*; **100** (14): 8372-7.

Piccirillo, C. A., Letterio, J. J., Thornton, A. M., Mchugh, R. S., Mamura, M., Mizuhara, H. and Shevach, E. M. (2002). "CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor β 1 production and responsiveness." *J Exp Med*; **196** (2): 237-46.

Pillai, V., Ortega, S. B., Wang, C. K. and Karandikar, N. J. (2007). "Transient regulatory T-cells: a state attained by all activated human T-cells." *Clin Immunol*; **123** (1): 18-29.

Porrata, L. F., Gertz, M. A., Geyer, S. M., Litzow, M. R., Gastineau, D. A., Moore, S. B., Pineda, A. A., Bundy, K. L., Padley, D. J., Persky, D., Lacy, M. Q., Dispenzieri, A., Snow, D. S. and Markovic, S. N. (2004). "The dose of infused lymphocytes in the autograft directly correlates with clinical outcome after autologous peripheral blood hematopoietic stem cell transplantation in multiple myeloma." *Leukemia*; **18** (6): 1085-92.

Porrata, L. F., Gertz, M. A., Inwards, D. J., Litzow, M. R., Lacy, M. Q., Tefferi, A., Gastineau, D. A., Dispenzieri, A., Ansell, S. M., Micallef, I. N., Geyer, S. M. and Markovic, S. N. (2001). "Early lymphocyte recovery predicts superior survival after autologous hematopoietic stem cell transplantation in multiple myeloma or non-Hodgkin lymphoma." *Blood*; **98** (3): 579-85.

Prabhala, R. H., Neri, P., Bae, J. E., Tassone, P., Shamma, M. A., Allam, C. K., Daley, J. F., Chauhan, D., Blanchard, E., Thatte, H. S., Anderson, K. C. and Munshi, N. C. (2006). "Dysfunctional T regulatory cells in multiple myeloma." *Blood*; **107** (1): 301-4.

Quach, H., Ritchie, D., Neeson, P., Harrison, S., Tai, T., Tainton, K., Lynch, K. and Prince, M. (2008). "Regulatory T Cells (Treg) Are Depressed in Patients with Relapsed/ Refractory Multiple Myeloma (MM) and Increases towards Normal Range in Responding Patients Treated with Lenalidomide (LEN)." *ASH*; **1696** (Saturday, December 6, 2008, 5:30 PM-7:30 PM Hall A (Moscone Center) Poster Board I-801.

Radvanyi, L. G., Shi, Y., Vaziri, H., Sharma, A., Dhala, R., Mills, G. B. and Miller, R. G. (1996). "CD28 costimulation inhibits TCR-induced apoptosis during a primary T cell response." *J Immunol*; **156** (5): 1788-98.

Raz, D. J., He, B., Rosell, R. and Jablons, D. M. (2006). "Bronchioloalveolar carcinoma: a review." *Clin Lung Cancer*; **7** (5): 313-22.

Read, S., Greenwald, R., Izcue, A., Robinson, N., Mandelbrot, D., Francisco, L., Sharpe, A. H. and Powrie, F. (2006). "Blockade of CTLA-4 on CD4+CD25+ regulatory T cells abrogates their function in vivo." *J Immunol*; **177** (7): 4376-83.

Read, S., Malmstrom, V. and Powrie, F. (2000). "Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation." *J Exp Med*; **192** (2): 295-302.

Rebmann, V., Wagner, S. and Grosse-Wilde, H. (2007). "HLA-G expression in malignant melanoma." *Semin Cancer Biol*; **17** (6): 422-9.

Romagnani, S. (1999). "Th1/Th2 cells." *Inflamm Bowel Dis*; **5** (4): 285-94.

Roncador, G., Brown, P. J., Maestre, L., Hue, S., Martinez-Torrecuadrada, J. L., Ling, K. L., Pratap, S., Toms, C., Fox, B. C., Cerundolo, V., Powrie, F. and Banham, A. H.

- (2005). "Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level." *Eur J Immunol*; **35** (6): 1681-91.
- Rosenberg, S. A. (2004). "Shedding light on immunotherapy for cancer." *N Engl J Med*; **350** (14): 1461-3.
- Rosti, G., Bevilacqua, G., Bidoli, P., Portalone, L., Santo, A. and Genestreti, G. (2006). "Small cell lung cancer." *Ann Oncol*; **17 Suppl 2**: ii5-10.
- Ruffini, P. A., Biragyn, A. and Kwak, L. W. (2002). "Recent advances in multiple myeloma immunotherapy." *Biomed Pharmacother*; **56** (3): 129-32.
- Sakaguchi, S. (2004). "Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses." *Annu Rev Immunol*; **22**: 531-62.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. and Toda, M. (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." *J Immunol*; **155** (3): 1151-64.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Shimizu, J., Yamazaki, S., Sakihama, T., Itoh, M., Kuniyasu, Y., Nomura, T., Toda, M. and Takahashi, T. (2001). "Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance." *Immunol Rev*; **182**: 18-32.
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T. and Ono, M. (2008). "Regulatory T cells and immune tolerance." *Cell*; **133** (5): 775-87.
- Santana, M. A. and Rosenstein, Y. (2003). "What it takes to become an effector T cell: the process, the cells involved, and the mechanisms." *J Cell Physiol*; **195** (3): 392-401.
- Sasada, T., Kimura, M., Yoshida, Y., Kanai, M. and Takabayashi, A. (2003). "CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression." *Cancer*; **98** (5): 1089-99.
- Schaefer, C., Kim, G. G., Albers, A., Hoermann, K., Myers, E. N. and Whiteside, T. L. (2005). "Characteristics of CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer." *Br J Cancer*; **92** (5): 913-20.
- Scharton, T. M. and Scott, P. (1993). "Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice." *J Exp Med*; **178** (2): 567-77.
- Seddiki, N., Santner-Nanan, B., Tangye, S. G., Alexander, S. I., Solomon, M., Lee, S., Nanan, R. and Fazekas De Saint Groth, B. (2006). "Persistence of naive CD45RA+ regulatory T cells in adult life." *Blood*; **107** (7): 2830-8.

- Seddon, B. and Mason, D. (2000). "The third function of the thymus." *Immunol Today*; **21** (2): 95-9.
- Sekido, Y., Fong, K. M. and Minna, J. D. (2003). "Molecular genetics of lung cancer." *Annu Rev Med*; **54**: 73-87.
- Serra, P., Amrani, A., Yamanouchi, J., Han, B., Thiessen, S., Utsugi, T., Verdaguer, J. and Santamaria, P. (2003). "CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4+CD25+ T cells." *Immunity*; **19** (6): 877-89.
- Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T. and Sakaguchi, S. (2005). "Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization." *J Exp Med*; **201** (5): 723-35.
- Shevach, E. M. (2002). "CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers." *Nat Rev Immunol*; **2** (6): 389-400.
- Shevach, E. M., Dipaolo, R. A., Andersson, J., Zhao, D. M., Stephens, G. L. and Thornton, A. M. (2006). "The lifestyle of naturally occurring CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells." *Immunol Rev*; **212**: 60-73.
- Shevach, E. M., Mchugh, R. S., Piccirillo, C. A. and Thornton, A. M. (2001). "Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells." *Immunol Rev*; **182**: 58-67.
- Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y. and Sakaguchi, S. (2002). "Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance." *Nat Immunol*; **3** (2): 135-42.
- Skapenko, A., Kalden, J. R., Lipsky, P. E. and Schulze-Koops, H. (2005). "The IL-4 receptor alpha-chain-binding cytokines, IL-4 and IL-13, induce forkhead box P3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells from CD25-CD4+ precursors." *J Immunol*; **175** (9): 6107-16.
- Sojka, D. K., Hughson, A., Sukiennicki, T. L. and Fowell, D. J. (2005). "Early kinetic window of target T cell susceptibility to CD25+ regulatory T cell activity." *J Immunol*; **175** (11): 7274-80.
- Song, X. T., Evel-Kabler, K., Shen, L., Rollins, L., Huang, X. F. and Chen, S. Y. (2008). "A20 is an antigen presentation attenuator, and its inhibition overcomes regulatory T cell-mediated suppression." *Nat Med*; **14** (3): 258-65.
- Stein, M. I., Zhu, J. and Emerson, S. G. (2004). "Molecular pathways regulating the self-renewal of hematopoietic stem cells." *Exp Hematol*; **32** (12): 1129-36.
- Stenger, S., Thuring, H., Rollinghoff, M. and Bogdan, C. (1994). "Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*." *J Exp Med*; **180** (3): 783-93.

Stephens, L. A., Gray, D. and Anderton, S. M. (2005). "CD4+CD25+ regulatory T cells limit the risk of autoimmune disease arising from T cell receptor crossreactivity." *Proc Natl Acad Sci U S A*; **102** (48): 17418-23.

Stockinger, B. (1999). "T lymphocyte tolerance: from thymic deletion to peripheral control mechanisms." *Adv Immunol*; **71**: 229-65.

Stockis, J., Fink, W., Francois, V., Connerotte, T., De Smet, C., Knoop, L., Van Der Bruggen, P., Boon, T., Coulie, P. G. and Lucas, S. (2009). "Comparison of stable human Treg and Th clones by transcriptional profiling." *Eur J Immunol*; **39** (3): 869-82.

Strauss, L., Whiteside, T. L., Knights, A., Bergmann, C., Knuth, A. and Zippelius, A. (2007). "Selective survival of naturally occurring human CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells cultured with rapamycin." *J Immunol*; **178** (1): 320-9.

Subramanian, J. and Govindan, R. (2007). "Lung cancer in never smokers: a review." *J Clin Oncol*; **25** (5): 561-70.

Szanya, V., Ermann, J., Taylor, C., Holness, C. and Fathman, C. G. (2002). "The subpopulation of CD4+CD25+ splenocytes that delays adoptive transfer of diabetes expresses L-selectin and high levels of CCR7." *J Immunol*; **169** (5): 2461-5.

Szczepanski, M. J., Szajnik, M., Czystowska, M., Mandapathil, M., Strauss, L., Welsh, A., Foon, K. A., Whiteside, T. L. and Boyiadzis, M. (2009). "Increased frequency and suppression by regulatory T cells in patients with acute myelogenous leukemia." *Clin Cancer Res*; **15** (10): 3325-32.

Taams, L. S., Vukmanovic-Stejic, M., Smith, J., Dunne, P. J., Fletcher, J. M., Plunkett, F. J., Ebeling, S. B., Lombardi, G., Rustin, M. H., Bijlsma, J. W., Lefeber, F. P., Salmon, M. and Akbar, A. N. (2002). "Antigen-specific T cell suppression by human CD4+CD25+ regulatory T cells." *Eur J Immunol*; **32** (6): 1621-30.

Tadokoro, C. E., Shakhar, G., Shen, S., Ding, Y., Lino, A. C., Maraver, A., Lafaille, J. J. and Dustin, M. L. (2006). "Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo." *J Exp Med*; **203** (3): 505-11.

Takahashi, T., Kuniyasu, Y., Toda, M., Sakaguchi, N., Itoh, M., Iwata, M., Shimizu, J. and Sakaguchi, S. (1998). "Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state." *Int Immunol*; **10** (12): 1969-80.

Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T. W. and Sakaguchi, S. (2000). "Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4." *J Exp Med*; **192** (2): 303-10.

Tang, Q., Adams, J. Y., Tooley, A. J., Bi, M., Fife, B. T., Serra, P., Santamaria, P., Locksley, R. M., Krummel, M. F. and Bluestone, J. A. (2006). "Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice." *Nat Immunol*; **7** (1): 83-92.

- Tang, Q., Henriksen, K. J., Bi, M., Finger, E. B., Szot, G., Ye, J., Masteller, E. L., Mcdevitt, H., Bonyhadi, M. and Bluestone, J. A. (2004). "In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes." *J Exp Med*; **199** (11): 1455-65.
- Terui, K., Takahashi, Y., Kitazawa, J., Toki, T., Yokoyama, M. and Ito, E. (2000). "Expression of transcription factors during megakaryocytic differentiation of CD34+ cells from human cord blood induced by thrombopoietin." *Tohoku J Exp Med*; **192** (4): 259-73.
- Thornton, A. M. and Shevach, E. M. (1998). "CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production." *J Exp Med*; **188** (2): 287-96.
- Thornton, A. M. and Shevach, E. M. (2000). "Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific." *J Immunol*; **164** (1): 183-90.
- Toh, C. K., Wong, E. H., Lim, W. T., Leong, S. S., Fong, K. W., Wee, J. and Tan, E. H. (2004). "The impact of smoking status on the behavior and survival outcome of patients with advanced non-small cell lung cancer: a retrospective analysis." *Chest*; **126** (6): 1750-6.
- Tone, M., Tone, Y., Adams, E., Yates, S. F., Frewin, M. R., Cobbold, S. P. and Waldmann, H. (2003). "Mouse glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand is costimulatory for T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A*; **100** (25): 15059-64.
- Tran, D. Q., Ramsey, H. and Shevach, E. M. (2007). "Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype." *Blood*; **110** (8): 2983-90.
- Travis, W. D., Travis, L. B. and Devesa, S. S. (1995). "Lung cancer." *Cancer*; **75** (1 Suppl): 191-202.
- Tricot, G. (2000). Multiple Myeloma and Other Plasma Cell Disorders. Hematology: Basic Principles and Practice. B. Hoffman, Shattil, Furie, Cohen, Silberstein, Mc Glave, Churchill-Livingstone: pp 1398-1416.
- Tzankov, A., Meier, C., Hirschmann, P., Went, P., Pileri, S. A. and Dirnhofer, S. (2008). "Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma." *Haematologica*; **93** (2): 193-200.
- Tze, L. E., Schram, B. R., Lam, K. P., Hogquist, K. A., Hippen, K. L., Liu, J., Shinton, S. A., Otipoby, K. L., Rodine, P. R., Vegoe, A. L., Kraus, M., Hardy, R. R., Schlissel, M. S., Rajewsky, K. and Behrens, T. W. (2005). "Basal immunoglobulin signaling actively maintains developmental stage in immature B cells." *PLoS Biol*; **3** (3): e82.

- Vigui r, M., Lemaitre, F., Verola, O., Cho, M. S., Gorochov, G., Dubertret, L., Bachelez, H., Kourilsky, P. and Ferradini, L. (2004). "Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells." *J Immunol*; **173** (2): 1444-53.
- Walker, M. R., Kasproicz, D. J., Gersuk, V. H., Benard, A., Van Landeghen, M., Buckner, J. H. and Ziegler, S. F. (2003). "Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells." *J Clin Invest*; **112** (9): 1437-43.
- Wang, H. Y., Lee, D. A., Peng, G., Guo, Z., Li, Y., Kiniwa, Y., Shevach, E. M. and Wang, R. F. (2004). "Tumor-specific human CD4+ regulatory T cells and their ligands: implications for immunotherapy." *Immunity*; **20** (1): 107-18.
- Wang, J., Ioan-Facsinay, A., Van Der Voort, E. I., Huizinga, T. W. and Toes, R. E. (2007). "Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells." *Eur J Immunol*; **37** (1): 129-38.
- Wang, X., Zheng, J., Liu, J., Yao, J., He, Y., Li, X., Yu, J., Yang, J., Liu, Z. and Huang, S. (2005). "Increased population of CD4(+)CD25(high), regulatory T cells with their higher apoptotic and proliferating status in peripheral blood of acute myeloid leukemia patients." *Eur J Haematol*; **75** (6): 468-76.
- Weaver, C. T., Hatton, R. D., Mangan, P. R. and Harrington, L. E. (2007). "IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages." *Annu Rev Immunol*; **25**: 821-52.
- Wichlan, D. G., Roddam, P. L., Eldridge, P., Handgretinger, R. and Riberdy, J. M. (2006). "Efficient and reproducible large-scale isolation of human CD4+ CD25+ regulatory T cells with potent suppressor activity." *J Immunol Methods*; **315** (1-2): 27-36.
- Wolf, A. M., Wolf, D., Steurer, M., Gastl, G., Gunsilius, E. and Grubeck-Loebenst in, B. (2003). "Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients." *Clin Cancer Res*; **9** (2): 606-12.
- Wolf, D., Rumpold, H., Koppelstatter, C., Gastl, G. A., Steurer, M., Mayer, G., Gunsilius, E., Tilg, H. and Wolf, A. M. (2006). "Telomere length of in vivo expanded CD4(+)CD25 (+) regulatory T-cells is preserved in cancer patients." *Cancer Immunol Immunother*; **55** (10): 1198-208.
- Woo, E. Y., Chu, C. S., Goletz, T. J., Schlienger, K., Yeh, H., Coukos, G., Rubin, S. C., Kaiser, L. R. and June, C. H. (2001). "Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer." *Cancer Res*; **61** (12): 4766-72.
- Woo, E. Y., Yeh, H., Chu, C. S., Schlienger, K., Carroll, R. G., Riley, J. L., Kaiser, L. R. and June, C. H. (2002). "Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation." *J Immunol*; **168** (9): 4272-6.

- Xystrakis, E., Boswell, S. E. and Hawrylowicz, C. M. (2006). "T regulatory cells and the control of allergic disease." *Expert Opin Biol Ther*; **6** (2): 121-33.
- Yagi, H., Nomura, T., Nakamura, K., Yamazaki, S., Kitawaki, T., Hori, S., Maeda, M., Onodera, M., Uchiyama, T., Fujii, S. and Sakaguchi, S. (2004). "Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells." *Int Immunol*; **16** (11): 1643-56.
- Yang, Z. Z., Novak, A. J., Stenson, M. J., Witzig, T. E. and Ansell, S. M. (2006). "Intratumoral CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma." *Blood*; **107** (9): 3639-46.
- Yi, H., Zhen, Y., Jiang, L., Zheng, J. and Zhao, Y. (2006). "The phenotypic characterization of naturally occurring regulatory CD4+CD25+ T cells." *Cell Mol Immunol*; **3** (3): 189-95.
- Young, N. T., Waller, E. C., Patel, R., Roghanian, A., Austyn, J. M. and Trowsdale, J. (2008). "The inhibitory receptor LILRB1 modulates the differentiation and regulatory potential of human dendritic cells." *Blood*; **111** (6): 3090-6.
- Zhu, J. and Emerson, S. G. (2002). "Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment." *Oncogene*; **21** (21): 3295-313.
- Ziegler, S. F. (2007). "FOXP3: not just for regulatory T cells anymore." *Eur J Immunol*; **37** (1): 21-3.
- Zou, L., Barnett, B., Safah, H., Larussa, V. F., Evdemon-Hogan, M., Mottram, P., Wei, S., David, O., Curiel, T. J. and Zou, W. (2004). "Bone marrow is a reservoir for CD4+CD25+ regulatory T cells that traffic through CXCL12/CXCR4 signals." *Cancer Res*; **64** (22): 8451-5.

Danksagung

Danken möchte ich zunächst Herrn Prof. Dr. B. Opalka für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die Betreuung und Unterstützung während des praktischen und schriftlichen Teils meiner Arbeit, sowie für die Bewertung dieser Arbeit als Gutachter. Außerdem möchte ich ihm und Herrn PD Dr. P. Schütt für die Übernahme der Projektleitung danken.

Ich möchte der Alfried Krupp von Bohlen und Halbach-Stiftung für die Finanzierung des Projektes danken.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. M.R. Nowrousian, Herrn Prof. Dr. T. Moritz, Herrn Dr. V. Teichgräber, Frau Dr. S. Ebert und Herrn PD Dr. P. Schütt sowie allen beteiligten Mitarbeitern des ärztlichen Teams, für ihre Hilfe bei medizinischen Fragen und die Bereitstellung der Blut- und Knochenmarkproben.

Ich danke Frau Dr. U. Buttke und Herrn Dr. D. Brandhorst für ihre Unterstützung bei der Arbeit im Labor, ihre ständige Diskussionsbereitschaft und ihre Hilfe bei der Auswertung der Treg-Analysen bei MM-Patienten.

Bei Herrn W. Stellberg möchte ich mich für seine große Hilfe bei den durchflußzytometrischen Analysen und bei der Weiterleitung der Blut- und Knochenmarkproben bedanken.

Herrn K. Lennartz danke ich für die Unterstützung bei der Isolierung der Treg mittels eines präparativen Durchflußzytometers und für seine vielen Ideen zur Verbesserung der Reinheit und Ausbeute.

Bei Frau PD Dr. M. Lindemann und ihren Mitarbeitern am Institut für Immunologie möchte ich mich für die Durchführung der Tritium-Thymidin-Auswertungen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. V. Kleff, Frau Dr. I. Rattmann, Frau Dr. U. Jünemann, Herrn M. Möllmann und Frau A. Feldmann für ihre große Unterstützung, die gute Stimmung im Labor und die sehr gute Zusammenarbeit.

Ein herzliches Dankeschön gilt meinen Eltern und Dr. Carsten Ludwig, die mich während meiner Doktorarbeit immer liebevoll unterstützt haben und mir eine sehr große Hilfe waren.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Hülsmann
Vorname	Bärbel
Geburtsdatum/-ort	02.10.1978, Münster
Familienstand	ledig

Curriculum Vitae

1985 - 1989	Martini Grundschule in Münster
1989 - 1998	Annette-von-Droste-Hülshoff-Gymnasium in Münster Abschluss: Abitur
10.1998	Aufnahme des Diplomstudienganges Biologie an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
09.2001	Vordiplom (Prüfungsfächer: allgemeine Biologie, Chemie und Mathematik)
09.2003 – 08.2004	Anfertigung der Diplomarbeit an der Westfälischen Wilhelms- Universität Münster, Institut für allgemeine Zoologie und Genetik Titel der Arbeit: „Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation der Proteine Def-6 (SLAT; IBP) und SWAP-70“
08.2004	Abschluss des Studiums als Diplom-Biologin
seit 07.2005	Doktorandin am Universitätsklinikum Essen, Innere Klinik - Tumorforschung, Labor von Prof. Dr. B. Opalka

Oktober, 2009

Bärbel Hülsmann

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Untersuchungen zu regulatorischen T-Zellen (Treg) beim Multiplen Myelom“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Bärbel Hülsmann befürworte.

Essen, den _____
Unterschrift d. wissenschaftl. Betreuers / Mitglieds
der Universität Duisburg-Essen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____
Unterschrift des/r Doktoranden/in

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den _____
Unterschrift des Doktoranden